



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS Y
EVALUACIÓN DE SU EFECTO SOBRE LAS PROPIEDADES DE BARRERA DE
LA PIEL**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

QFB. MARÍA DEL ROSARIO LÓPEZ GARCÍA

TUTORA: DRA. FLORA ADRIANA GANEM RONDERO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MÉXICO, D.F., JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS OFICIALES

A la UNAM por brindarme la mejor formación académica que pudiera recibir.

A mi tutora, la Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, por su apoyo, guía y consejo brindado durante la realización de este trabajo de tesis.

Al CONACYT por la beca otorgada (271124) para realizar mis estudios de maestría.

A los proyectos CONACYT (129320) y PAPIIT (IN216313) por los recursos otorgados para la realización de este proyecto.

Al técnico en microscopía, Sr. Rodolfo Robles Gómez del laboratorio de microscopía de la FES-Cuautitlán, Campo 1, por su apoyo para la obtención de las fotografías de microscopía electrónica de barrido.

A los miembros de jurado,

Presidente: Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas

Vocal: Dra. Helgi Jung Cook

Vocal: Dr. Emilio Bucio Carrillo

Vocal: Dr. Efrén Hernández Baltazar

Secretario: Dra. Elizabeth Piñón Segundo

por sus observaciones que aportaron y enriquecieron esta tesis.

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM.

Presentaciones en congresos:

XLVI Congreso Nacional y V Internacional de Ciencias Farmacéuticas

Cancún, México, octubre del 2013

Cartel: "Preparación, caracterización y evaluación del efecto oclusivo *in vitro* de nanopartículas lipídicas."

QuimiUNAM 2013

Ciudad Universitaria, UNAM, México 2013

Cartel: "Preparation, characterization and *in vitro* occlusive effect assessment of lipid nanoparticles."

Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	3
ÍNDICE DE TABLAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN.....	10
MARCO TEÓRICO.....	11
1. Nanotecnología y nanopartículas	11
1.1. Nanotecnología	11
1.2. Nanopartículas lipídicas.....	11
2. Piel.....	14
2.1. Morfofisiología	15
2.2. El estrato córneo y las funciones de barrera de la piel	16
2.2.1. Formación del EC.....	17
2.2.2. Lípidos del EC.....	17
2.3. Mecanismos de transporte a través de la piel	18
3. Interacción de las nanopartículas lipídicas con la piel	18
4. Aplicaciones de las nanopartículas lipídicas para administración tópica.....	20
4.1. Aplicaciones farmacéuticas	20
4.2. Aplicaciones cosméticas	20
4.3. Referencias de aplicaciones de las nanopartículas lipídicas para administración tópica.	20
OBJETIVOS.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos particulares	24
HIPÓTESIS.....	24
METODOLOGÍA	25
1. Materiales	25
1.1. Equipo	25
1.2. Reactivos	25
1.3. Material biológico.....	25

2.	Procedimiento	26
2.1.	Determinación de las condiciones de preparación de las nanopartículas	26
2.2.	Caracterización de las nanopartículas	27
2.3.	Prueba de estabilidad.....	27
2.4.	Prueba de oclusión <i>in vitro</i>	28
2.5.	Pérdida de agua transepidermal en piel de cerdo	29
2.6.	Estudio de penetración en piel de cerdo	30
2.7.	Análisis estadístico.....	31
	RESULTADOS Y ANÁLISIS	32
1.	Determinación de las condiciones de preparación de las nanopartículas lipídicas.	32
2.	Caracterización de las nanopartículas lipídicas.....	34
3.	Prueba de estabilidad.....	37
4.	Prueba de oclusión <i>in vitro</i>	40
5.	Pérdida de agua transepidermal en piel de cerdo	42
6.	Estudio de penetración en piel de cerdo	45
	CONCLUSIONES	47
	PERSPECTIVAS	48
	BIBLIOGRAFÍA.....	49
	ANEXOS	53
	ANEXO I. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS LÍPIDOS Y ESTABILIZANTES.....	53
	ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: CONDICIONES DE PREPARACIÓN.....	55
	ANEXO III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ESTABILIDAD.....	59
	ANEXO IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: OCLUSIÓN <i>IN VITRO</i>	67
	ANEXO V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: TEWL EN PIEL DE CERDO	68
	ANEXO VI. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ROJO DE NILO	69
	ANEXO VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: PRUEBA DE PENETRACIÓN	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de la estructura cristalina de a) SLN y b) NLC.	12
Figura 2. Representación esquemática de las técnicas de HPH en caliente y frío para la producción de SLN.	13
Figura 3. Corte transversal de la piel.	15
Figura 4. Capas de la epidermis.	16
Figura 5. Representación de la formación de los lípidos epidérmicos.	17
Figura 6. Mecanismos de transporte a través de la piel.	18
Figura 7. Esquema que representa el efecto del tiempo de exposición y tamaño de partícula sobre la penetración.	19
Figura 8. Esquema que representa el proceso de preparación de los SLN o NLC por el método optimizado de homogenización a alto cizallamiento.	26
Figura 9. a) celda de vidrio de apertura cuadrada, b) la celda de potencial Z y c) Zetasizer Nano-ZS90 Malvern.	27
Figura 10. Prueba de oclusión <i>in vitro</i> por el método de De Vringer modificado.	28
Figura 11. Metodología aplicada para determinar pérdida de agua transepidermal (TEWL) en piel de cerdo.	29
Figura 12. Metodología aplicada para estudiar la penetración de las nanopartículas lipídicas.	31
Figura 13. Gráfico de la reducción en porcentaje del tamaño de partícula de las SLN en función del tiempo de agitación (20,000 rpm, Lutrol® F-68).	33
Figura 14. Gráficos de distribución del tamaño de partícula de a)SLN y b)NLC.	35
Figura 15. Fotografías de MEB de a)SLN y b)NLC. La barra equivale a 1 μm	37
Figura 16. Estabilidad de las SLN. a) Tamaño de partícula, b) índice de polidispersión y c) potencial Z a los 0, 8, 15, 30, 60 y 90 días.	38
Figura 17. Estabilidad de los NLC. a) Tamaño de partícula, b) índice de polidispersión y c) potencial Z a los 0, 8, 15, 30, 60 y 90 días.	39
Figura 18. Efecto oclusivo de las SLN y los NLC. Se observa el valor de F en función del tiempo.	40
Figura 19. Fotografías de MEB del papel filtro solo y con muestra de SLN o NLC.	41
Figura 20. Gráfico de la reducción en porcentaje del valor de TEWL de piel de cerdo tras su tratamiento con SLN y NLC.	42
Figura 21. Fotografías de MEB de piel de cerdo intacta con SLN y NLC.	43
Figura 22. Fotografías de MEB de piel de cerdo sin EC con SLN y NLC.	44

Figura 23. Gráfico de cantidad de rojo de nilo según la distancia de penetración.45

Figura 24. Formula estructural del monobehenato de glicerilo (las dos R=H), dibehenato de glicerilo (R=H y R=behenato) y tribehenato de glicerilo (las dos R= behenato).....53

Figura 25. Formula estructural del triglicérido cáprico/caprílico.....53

Figura 26. Fórmula estructural del poloxámero 188.54

Figura 27. Formula estructural del alcohol poli vinílico.....54

Figura 28. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor TIEMPO DE AGITACIÓN sobre la REDUCCIÓN DEL TAMAÑO (n=3).....55

Figura 29. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor TIEMPO DE SONICACIÓN sobre la TALLA (n=5).56

Figura 30. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor TIEMPO DE SONICACIÓN sobre el IP (n=5).....57

Figura 31. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor PROPORCIÓN sobre la TALLA (n=3). ..58

Figura 32. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre la TALLA (95% de Tukey, n=3).....59

Figura 33. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor CONDICION sobre el IP (n=3).60

Figura 34. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor DIA sobre el POTENCIAL Z (n=3).61

Figura 35. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre el POTENCIAL Z (95% de Tukey, n=3).61

Figura 36. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor DIA sobre el tamaño de partícula (n=3).....62

Figura 37. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor CONDICION sobre el tamaño de partícula (n=3).....63

Figura 38. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre la TALLA (95% de Tukey, n=3).....63

Figura 39. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor DIA sobre el IP (n=3).64

Figura 40. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre el IP (95% de Tukey, n=3).....65

Figura 41. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor CONDICION sobre el Potencial Z (n=3).....65

Figura 42. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre el POTENCIAL Z (95% de Tukey, n=3).66

Figura 43. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor TIEMPO sobre el Factor de oclusión F (n=3).....67

Figura 44. Curva de calibración de rojo de nilo en medio de metanol con EC.....70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Aplicaciones de las SLN y los NLC para administración tópica.	21
Tabla 2. Productos en el mercado a base de SLN y NLC.	23
Tabla 3. Tamaño de partícula obtenido con diferentes estabilizantes por el método de homogenización a alto cizallamiento (20,000 rpm, 1 min, 90°C)..	32
Tabla 4. Tamaño de partícula obtenido con diferentes tiempos de agitación (20,000 rpm, Lutrol® F-68). El resultado se expresa como la media \pm DE.	33
Tabla 5. Tamaño de partícula e IP obtenido tras aplicar sonicación en diferentes tiempos. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=5).	33
Tabla 6. Tamaño de partícula de los NLC según la proporción de lípido sólido/lípido líquido empleada. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=3).	34
Tabla 7. Tamaño de partícula, IP y potencial Z de las SLN y los NLC preparados. Los resultados se expresan como la media \pm DE.	35
Tabla 8. Valores basales de TEWL y humedad en piel de cerdo intacta y sin EC.	42
Tabla 9. Distancia máxima de penetración y cantidad total de rojo de nilo en el EC para las SLN y los NLC. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=6)	46
Tabla 10. Tabla ANOVA para REDUCCIÓN DEL TAMAÑO por TIEMPO DE AGITACIÓN.	55
Tabla 11. Pruebas de rangos múltiples para REDUCCIÓN DEL TAMAÑO por TIEMPO DE AGITACIÓN. Método: 95% Tukey HSD.	55
Tabla 12. Tabla ANOVA para TALLA por TIEMPO DE SONICACIÓN.	56
Tabla 13. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por TIEMPO DE SONICACIÓN.	56
Tabla 14. Tabla ANOVA para IP por TIEMPO DE SONICACIÓN.	57
Tabla 15. Pruebas de rangos múltiples para IP por TIEMPO DE SONICACIÓN.	57
Tabla 16. Tabla ANOVA para TALLA por PROPORCIÓN.	57
Tabla 17. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por PROPORCIÓN.	58
Tabla 18. Análisis de Varianza para TALLA de las SLN.	59
Tabla 19. Análisis de Varianza para IP de las SLN.	59
Tabla 20. Pruebas de rangos múltiples para IP por CONDICION de las SLN.	60
Tabla 21. Análisis de Varianza para POTENCIAL Z de los SLN.	60
Tabla 22. Pruebas de rangos múltiples para POTENCIAL Z por DIA de las SLN.	61
Tabla 23. Análisis de Varianza para TALLA de los NLC.	62
Tabla 24. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por DIA de los NLC.	62

Tabla 25. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por CONDICION de los NLC..	63
Tabla 26. Análisis de Varianza para IP de los NLC.	63
Tabla 27. Pruebas de rangos múltiples para IP por DIA de los NLC..	64
Tabla 28. Análisis de Varianza para POTENCIAL Z de los NLC.	65
Tabla 29. Pruebas de rangos múltiples para POTENCIAL Z por CONDICION de los NLC..	65
Tabla 30. Análisis de Varianza para el factor de oclusión F.	67
Tabla 31. Pruebas de rangos múltiples para F por TIEMPO..	67
Tabla 32. Datos de la Curva de Calibración de rojo de nilo.	69
Tabla 33. Parámetros de la curva de calibración de rojo de nilo	70

LISTA DE ABREVIATURAS

A	área
ANOVA	análisis de varianza
CV	coeficiente de variación
DE	desviación estándar
EC	estrato córneo
F	factor de oclusión
HPH	homogenización a alta presión
IP	índice de polidispersión
λ	longitud de onda
LC	límite de cuantificación
LD	límite de detección
MEB	microscopía electrónica de barrido
NLC	acarreadores lipídicos nanoestructurados
PIT	temperatura de inversión de fases
p/p	peso- peso
ρ	densidad
rpm	revoluciones por minuto
SLN	nanopartículas lipídicas sólidas
SP	factor de solubilidad

RESUMEN

Dos de los sistemas nanoacarreadores de más reciente creación, y que son altamente investigados y aplicados para la vía tópica, son las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN por sus siglas en inglés) y los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC por sus siglas en inglés).

En el presente trabajo se evaluó el efecto de las SLN y los NLC sobre las propiedades de barrera de la piel, en concreto sobre el efecto oclusivo que presentan (el cual se relaciona directamente con la pérdida de agua transepidermal) y también sobre su capacidad de penetración a través del estrato córneo (EC). Es importante conocer el desempeño que estos sistemas presentan por sí mismos, es decir, sin la inclusión de un fármaco o activo, con el fin de poder aprovechar sus características en función del sistema terapéutico o cosmético que se quiera diseñar.

Para este fin se requirió, en primer lugar, establecer las condiciones de preparación de estas nanopartículas lipídicas por el método de homogenización a alto cizallamiento. Ambos sistemas se prepararon a base de dibehenato de glicerilo, en tanto que para producir los NLC se agregó a la fórmula un aceite compuesto por triglicéridos cáprico/caprílico. Así se obtuvieron SLN y NLC que presentaron características fisicoquímicas muy similares con el fin de evaluar la manera en la que la inclusión de un aceite, en el caso de los NLC, modifica el efecto que estos sistemas tienen sobre la piel.

Se encontró que a pesar de las diferencias en la composición, el efecto oclusivo que producen estas nanopartículas lipídicas no es diferente. A través de la microscopía electrónica de barrido se confirmó que la película que forman estos sistemas, a la cual se le atribuye su capacidad de producir un efecto oclusivo, es físicamente similar. Por otro lado, se comprobó que los NLC penetran en mayor cantidad a través del EC. Se cree que esto se debe a que el aceite incluido en los NLC interacciona en mayor medida con los componentes de la bicapa lipídica intercelular del EC, por lo que su capacidad de penetración es mayor en comparación con las SLN.

Los resultados obtenidos servirán para el desarrollo de productos farmacéuticos y/o cosméticos, así como para la evaluación de diferentes sistemas en cuanto a sus propiedades para modificar las funciones de barrera de la piel.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha hecho evidente que no solo es necesario el desarrollo de nuevos fármacos para asegurar el éxito en el tratamiento de las enfermedades. Algunos de los principales problemas que surgen al emplear fármacos en nuevas terapias se relacionan con la incapacidad del activo para llegar y permanecer en el sitio de acción. Para solucionar estos problemas se han desarrollado sistemas acarreadores, los cuales permiten una liberación controlada y localizada del fármaco según las necesidades de la terapia (1).

La nanotecnología ha jugado un papel muy importante en este campo. Los nanoacarreadores, sistemas que tienen estructuras de tamaño menor a 500 nm, se han estado aplicando ampliamente para su administración por vía parenteral u oral. Sin embargo, el empleo de estos sistemas sobre la piel se ha convertido en el centro de atención en los últimos años (2).

La piel es una barrera única compuesta por varias capas heterogéneas altamente organizadas. De manera general se divide en tres secciones, del exterior al interior estas son la epidermis, dermis e hipodermis. La capa más externa de la epidermis, el estrato córneo (EC), es a la cual se le atribuye la función de la barrera de la piel, que impide el paso de agentes extraños incluyendo fármacos. La nanotecnología proporciona las herramientas para lograr atravesar la barrera de la piel, por lo que los sistemas de liberación tópica o transdérmica a base de nanoacarreadores se han convertido en el objetivo principal de muchos investigadores (3). Entre los sistemas acarreadores de fármacos de tamaño nanométrico destinados para la administración tópica y/o transdérmica se encuentran las nanopartículas lipídicas.

Las SLN se desarrollaron a principios de la década de los 90's como un sistema acarreador de fármacos alternativo a los nanoacarreadores ya existentes (e.g., liposomas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsiones). Como segunda generación de nanopartículas lipídicas surgen los NLC con mejoras en comparación con sus predecesoras, tales como mayor capacidad de carga y mejor estabilidad (4).

En la actualidad existen trabajos que reportan aplicaciones farmacéuticas y cosméticas de estos acarreadores para su aplicación por vía tópica, sin embargo, en algunos casos, la selección del tipo de nanopartículas lipídicas (SLN o NLC) a emplear como acarreador se hace de manera indiscriminada, ya que no existe un fundamento sobre el cual se justifique el empleo de un sistema u otro.

El objetivo de este trabajo fue evaluar y comparar el efecto de las SLN y los NLC sobre las propiedades de barrera de la piel, determinando su capacidad oclusiva y el grado de penetración, factores importantes en la eficacia de estos sistemas como acarreadores de activos cosméticos y/o farmacéuticos.

MARCO TEÓRICO

1. Nanotecnología y nanopartículas

1.1. Nanotecnología

La nanotecnología es el estudio de los materiales dentro de la escala nanométrica (10^{-9} m), e incluye la medición, modelado y manipulación de los materiales dentro de este marco (5). En la actualidad, la nanotecnología ha entrado de manera firme en el campo de la liberación de fármacos. El desempeño de los sistemas inteligentes de liberación controlada continuamente se mejora con el propósito de maximizar su actividad terapéutica y minimizar los efectos adversos (6). La nanotecnología se puede usar para modificar la permeación/penetración de sustancias encapsuladas a través de la manipulación de diferentes factores (7). Se ha demostrado que los sistemas de tamaño nanométrico pueden incrementar la solubilidad, mejorar la velocidad de disolución y la biodisponibilidad. Entre los sistemas acarreadores más estudiados se encuentran los liposomas, las microemulsiones y las nanopartículas sólidas. Las nanopartículas pueden prepararse usando diferentes materiales, por ejemplo, polímeros biodegradables y biocompatibles, fosfolípidos, surfactantes y lípidos (8).

1.2. Nanopartículas lipídicas

A principios de los 90's se desarrollan las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN por sus siglas en inglés) a partir de los conceptos de partículas sólidas, emulsiones y liposomas. Las SLN fueron producidas al intercambiar el aceite de una emulsión por un lípido sólido, lo que implica que el sistema será sólido tanto a temperatura ambiente como a temperatura corporal (4).

Las SLN presentan las ventajas de otros sistemas coloidales acarreadores de fármacos a la vez que se evitan algunas de sus desventajas (1).

- Posibilidad de liberación controlada y liberación dirigida
- Incrementa la estabilidad del fármaco
- Alta capacidad de carga
- Incorporación de fármacos lipofílicos e hidrofílicos
- Se evita el uso de disolventes orgánicos
- No biotóxico
- Fácil escalamiento

Sin embargo, las SLN presentan algunas desventajas como: aumento del tamaño de partícula durante el almacenamiento, transiciones en la forma cristalina del lípido, y baja capacidad de incorporación de fármacos debido a la estructura cristalina del lípido lo que también puede causar que las moléculas del fármaco tienden a ser expulsadas con el paso del tiempo (9).

Los acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC por sus siglas en inglés) surgen como la estrategia para disminuir el grado de organización de la matriz de lípido y así incrementar la capacidad de carga de fármacos. Estos sistemas se consideran la segunda generación de nanopartículas lipídicas y se producen usando una combinación de lípido sólido y lípido líquido (aceite), siendo esta mezcla sólida a temperatura ambiente y temperatura corporal al igual que las SLN (10).

A nivel de estructura cristalina, las SLN, al ser preparadas a base de un solo lípido, forman una matriz que tiende a ser una red cristalina relativamente perfecta la cual deja un espacio muy limitado para acomodar dentro algunas moléculas de fármaco. Las consecuencias son la baja capacidad de carga y la tendencia a expulsar el activo durante el almacenamiento. Por otro lado, con la mezcla de lípidos se logra una distorsión en la formación del cristal, por lo que la matriz resultante contiene imperfecciones que sirven como espacios donde se acomoda el activo (Figura 1) (11).

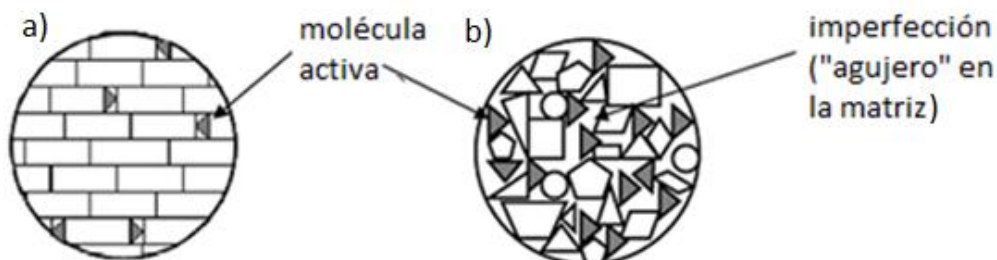


Figura 1. Comparación de la estructura cristalina de a) SLN y b) NLC.

La solubilidad de los fármacos en los aceites es generalmente mayor que en los lípidos sólidos, por lo que con los NLC se logra una mayor capacidad de carga de activos (9). Por lo tanto, basándose en este concepto, los NLC presentan una mejor capacidad de incorporación de fármacos al mismo tiempo que se evita la tendencia que tienen las SLN de expulsar los activos (10).

De manera general, para la preparación de estas nanopartículas lipídicas se necesitan como componentes uno o más lípidos, estabilizantes (emulsificantes) y agua. El término lípido empleado, en un sentido más amplio, incluye a los triglicéridos, glicéridos parciales, ácidos grasos, esteroides y ceras (1). La mayoría de lípidos usados están aprobados para su uso como aditivos en alimentos para humanos o se usan como excipientes en preparaciones tópicos cosméticas o farmacéuticas debido a su baja toxicidad (12).

1.2.1. Procesos de preparación

Los procesos de preparación son igualmente aplicables tanto para las SLN como para los NLC. La diferencia radica en la incorporación de solo un lípido sólido (SLN) o una mezcla de lípidos (NLC) (11). A continuación se describen los métodos empleados para preparar nanopartículas lipídicas.

- Homogenización a alta presión

El método más popular para producir SLN es la homogenización a alta presión (HPH por sus siglas en inglés) en sus dos modalidades, fría y caliente. En la HPH en caliente, el activo se disuelve en el lípido fundido y se dispersa en una solución del surfactante por agitación a alto cizallamiento. La pre-emulsión obtenida se pasa a través del homogenizador a alta presión. En la HPH en frío, el activo se disuelve o dispersa en el lípido fundido y posteriormente esta mezcla se enfría. El lípido solidificado es molido hasta obtener micropartículas las cuales se dispersan en una solución del surfactante y finalmente esta suspensión se hace pasar por el homogenizador a alta presión (4). En la Figura 2 se resumen los pasos a seguir para la producción de SLN por HPH.

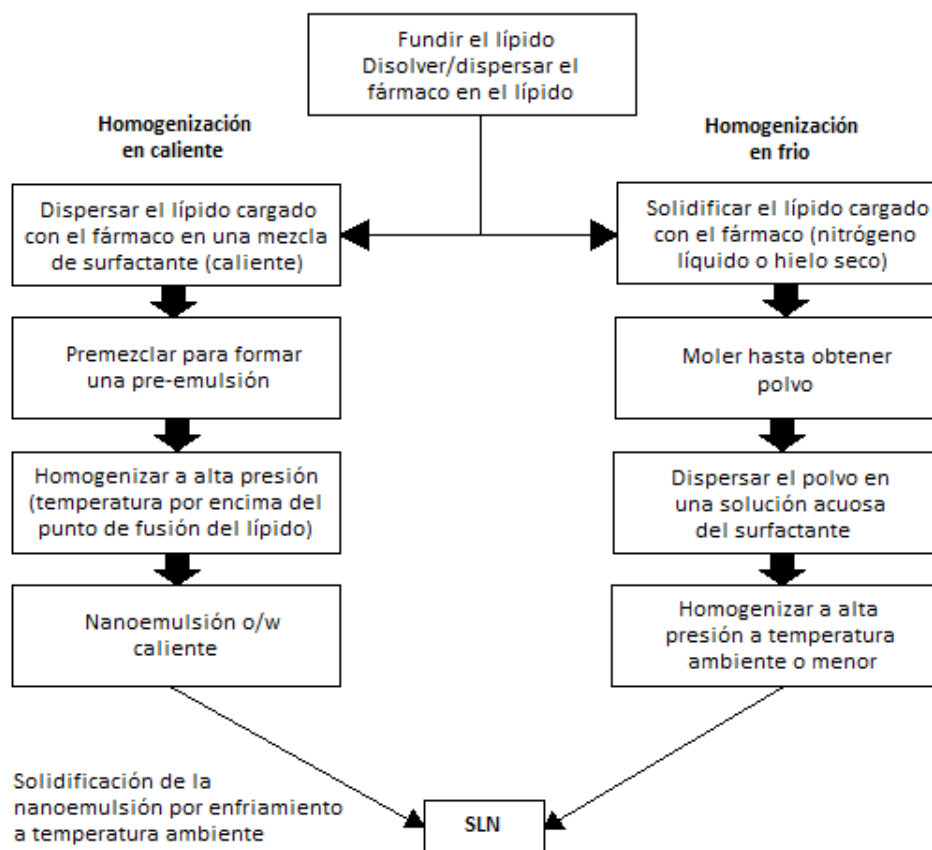


Figura 2. Representación esquemática de las técnicas de HPH en caliente y frío para la producción de SLN (1).

- Homogenización a alto cizallamiento y ultrasonido

Tanto la homogenización a alto cizallamiento como el ultrasonido son técnicas de dispersión que se usaron inicialmente para producir SLN y ambas tienen la característica de ser fáciles de aplicar. El homogenizador tipo rotor-estator se ha usado para producir emulsiones con el lípido fundido las cuales se hacen enfriar para obtener SLN. Se sabe que el tamaño de partícula y el potencial zeta de las SLN obtenidas se ven influenciados por los parámetros del proceso: tiempo de emulsificación, velocidad de agitación y condiciones de enfriamiento (1).

- Emulsificación/evaporación de disolvente

El componente lipofílico se disuelve en un disolvente orgánico inmiscible al agua y se emulsifica en una fase acuosa. Tras la evaporación del disolvente se forma una dispersión de nanopartículas por precipitación del lípido en el medio acuoso. El tamaño de partícula obtenido por este método depende de la concentración del lípido en la fase orgánica. A pesar de que se evita cualquier tipo de estrés térmico presente en las otras técnicas de producción, una clara desventaja de este método es el uso de disolventes orgánicos (1).

- Inyección de disolvente

En este método, los lípidos y el fármaco se disuelven en alcohol isopropílico el cual se encuentra 5°C por arriba del punto de fusión del lípido. De manera simultánea, se prepara una solución acuosa del emulsificante a la misma temperatura. La solución del lípido se adiciona a la solución acuosa bajo agitación continua, la cual se prolonga desde 3-4 h a 40°C hasta la completa evaporación del disolvente orgánico (13).

- Temperatura de inversión de fases (PIT por sus siglas en inglés)

En este método se calientan por separado la fase acuosa y la fase oleosa. La fase acuosa se añade gota a gota, a temperatura constante y bajo agitación, a la fase oleosa. La mezcla se enfría a temperatura ambiente bajo agitación lenta y continua. Cuando se alcanza la PIT, la mezcla pasa de turbia a clara (14).

- Emulsificación/ desplazamiento de disolvente

El proceso consiste en disolver el lípido en un disolvente parcialmente soluble al agua (previamente saturado con agua). Esta fase orgánica se emulsifica con una solución acuosa (previamente saturada con disolvente) la cual contiene el agente estabilizante. Esta emulsión aceite en agua se diluye con un exceso de agua a temperatura controlada para promover la difusión de la fase interna hacia la fase externa, causando la agregación del lípido en forma de SLN (15).

2. Piel

La piel es el órgano que cubre la superficie externa del cuerpo. En los adultos abarca una superficie de alrededor de 2 m² y pesa 4.5-5 kg. Su espesor varía entre 0.5 mm en los párpados hasta 4 mm en el talón. Sin embargo, en gran parte del cuerpo mide 1-2 mm (16).

2.1. Morfofisiología

La principal función de la piel es actuar como una barrera contra los organismos y el ambiente externo. Entre las principales funciones de la piel se incluyen: protección contra la radiación UV, daño físico, químico y ataque microbiano, mantiene la temperatura corporal y las funciones sensoriales tales como la sensación de dolor y de temperatura (7).

Estructuralmente la piel se divide en tres capas: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 3). La epidermis es la capa más externa la cual sirve de barrera física y química entre el interior del organismo y el ambiente externo. La dermis es la capa que provee soporte estructural a la piel. Debajo de esta se encuentra una capa de tejido conectivo, la hipodermis, que también constituye un importante depósito de grasa (17).

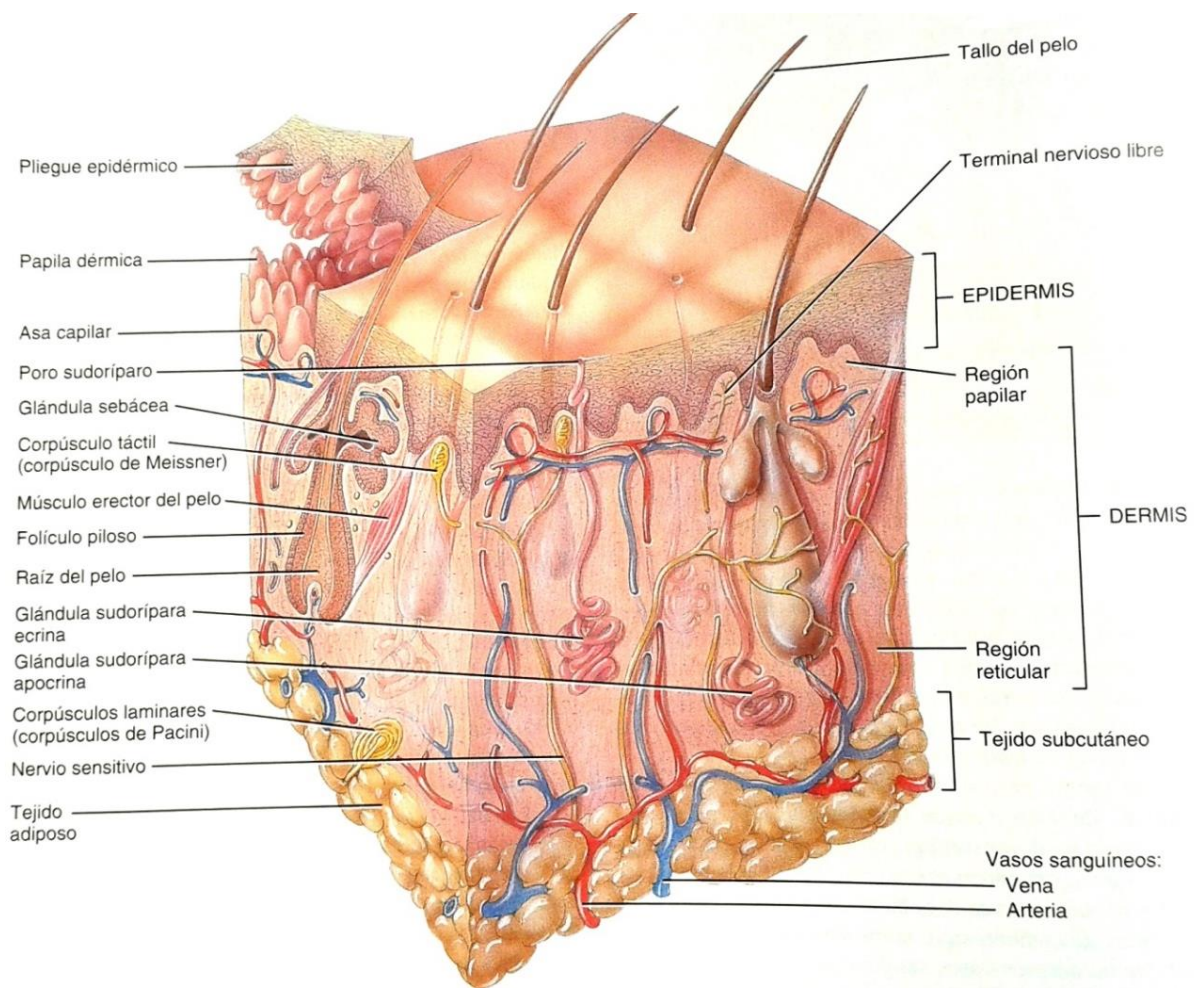


Figura 3. Corte transversal de la piel (16).

La epidermis está compuesta por un epitelio pavimentoso o plano estratificado queratinizado. Contiene cuatro principales tipos de células: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. Aproximadamente el 90% de las células epidérmicas son queratinocitos que se

encuentran en distintos estadios del desarrollo y que están distribuidos en 5 estratos (Figura 4): basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo (16).

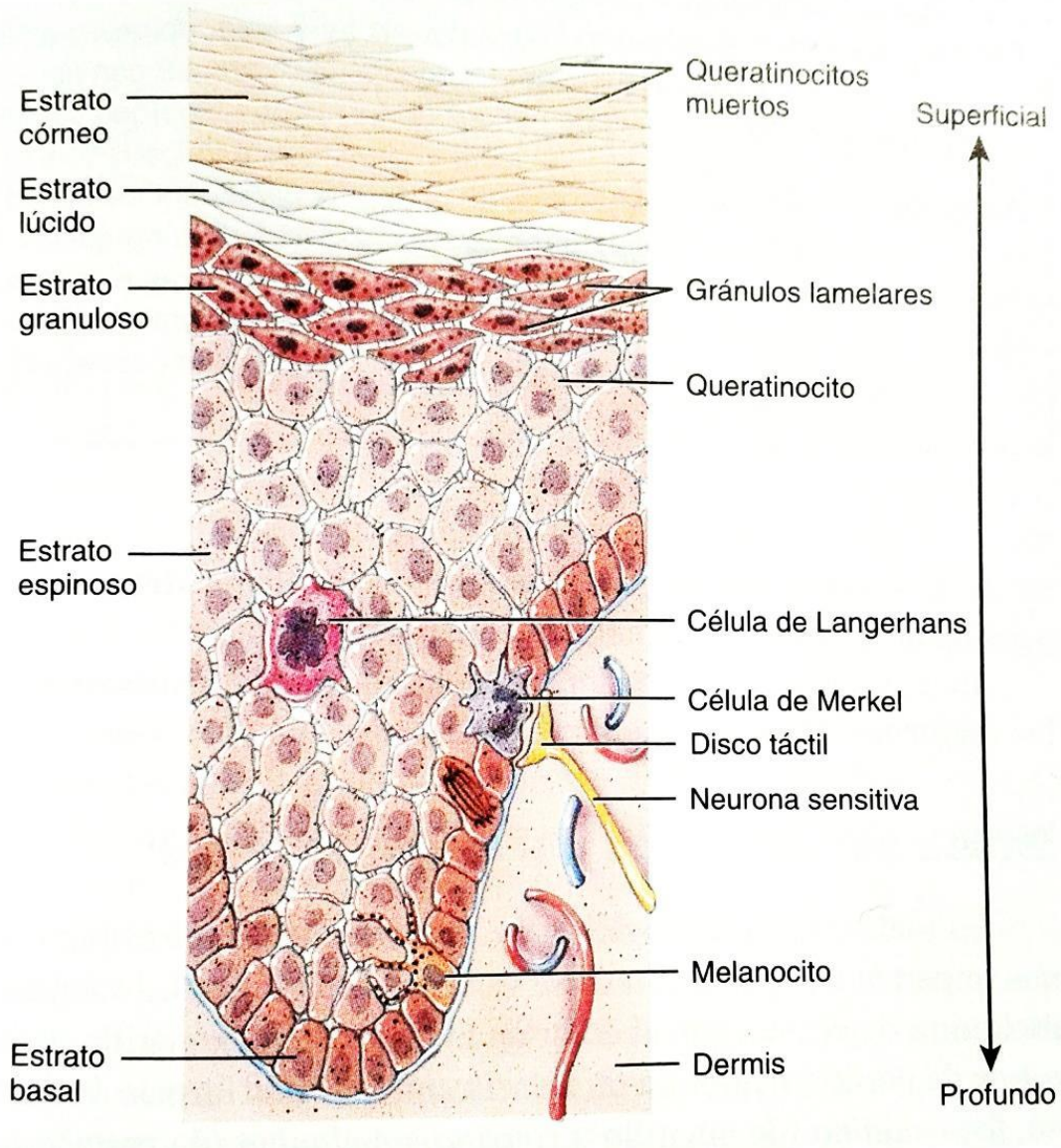


Figura 4. Capas de la epidermis (16).

2.2. El estrato córneo y las funciones de barrera de la piel

Como ya se mencionó, la epidermis se divide en varias capas, y su capa más externa, el estrato córneo (EC), es la responsable de la función de barrera de la piel debido a su alta lipofilia y la alta cohesión entre sus células (7).

Para las sustancias que buscan permear a través de la piel, la difusión a través del EC es el paso limitante en la penetración. De manera inversa, el EC es la principal barrera que impide la difusión del agua hacia fuera de la piel (18).

2.2.1. Formación del EC

Los queratinocitos experimentan un proceso de cornificación, en el cual las células se diferencian y se mueven hacia capas superiores desde el estrato basal, atravesando el estrato espinoso y el estrato granuloso hasta llegar a la capa más externa, el EC. Al alcanzar el EC, las células se vuelven anucleadas y aplanadas y reciben el nombre de corneocitos. Estos corneocitos ricos en proteínas del EC están empaquetados densamente en una matriz lipídica extracelular que se encuentra dispuesta en bicapas. A este arreglo se le conoce como de “ladrillos y cemento” (18).

2.2.2. Lípidos del EC

Los lípidos epidérmicos forman, junto con los corneocitos, la barrera hidrolipídica de la piel: debido a su especial composición de un 40 % de ceramidas, un 25 % de ácidos grasos libres y un 25 % de colesterol, juegan un papel esencial en la regulación del contenido de agua y humedad de la piel y de todo el organismo (19). Estos lípidos, especialmente las ceramidas, son componentes muy importantes en términos de las funciones de barrera (7).

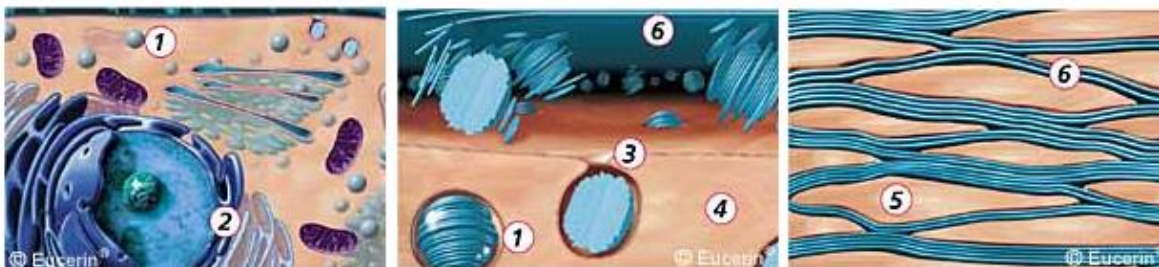


Figura 5. Representación de la formación de los lípidos epidérmicos. 1) cuerpos de Odland, 2) aparato de Golgi, 3) exocitosis, 4) células del estrato granuloso, 5) corneocitos, 6) Bicapas lipídicas (19).

A continuación se describe el proceso de formación de la matriz lipídica del EC (Figura 5). Las sustancias precursoras para la formación de los lípidos de la capa córnea se producen en el aparato de Golgi de las células córneas en estrato espinoso. Después son almacenadas intracelularmente en forma de membranas lipídicas dobles, en pequeños gránulos microscópicos (cuerpos de Odland). En la capa superior del estrato granuloso, los cuerpos de Odland son expulsados por exocitosis y se convierten en bicapas lipídicas organizadas en el espacio intercelular. Durante esta maduración, los glicolípidos, fosfolípidos y ésteres enzimáticos polares, se transforman en lípidos no polares como ceramidas y ácidos grasos esenciales. (19).

2.3. Mecanismos de transporte a través de la piel

A pesar de la eficiencia de las propiedades de barrera de la piel, algunas sustancias pueden penetrar a través de sus diferentes capas. Existen rutas de transporte pasivo por medio de las cuales una molécula puede atravesar el EC (Figura 6): intercelular (a través de la solubilización en los lípidos extracelulares arreglados en estructuras lamelares), transcelulares (a través de los corneocitos y las bicapas lipídicas) y a través de los apéndices (glándulas sudoríparas o folículos pilosos) (7).

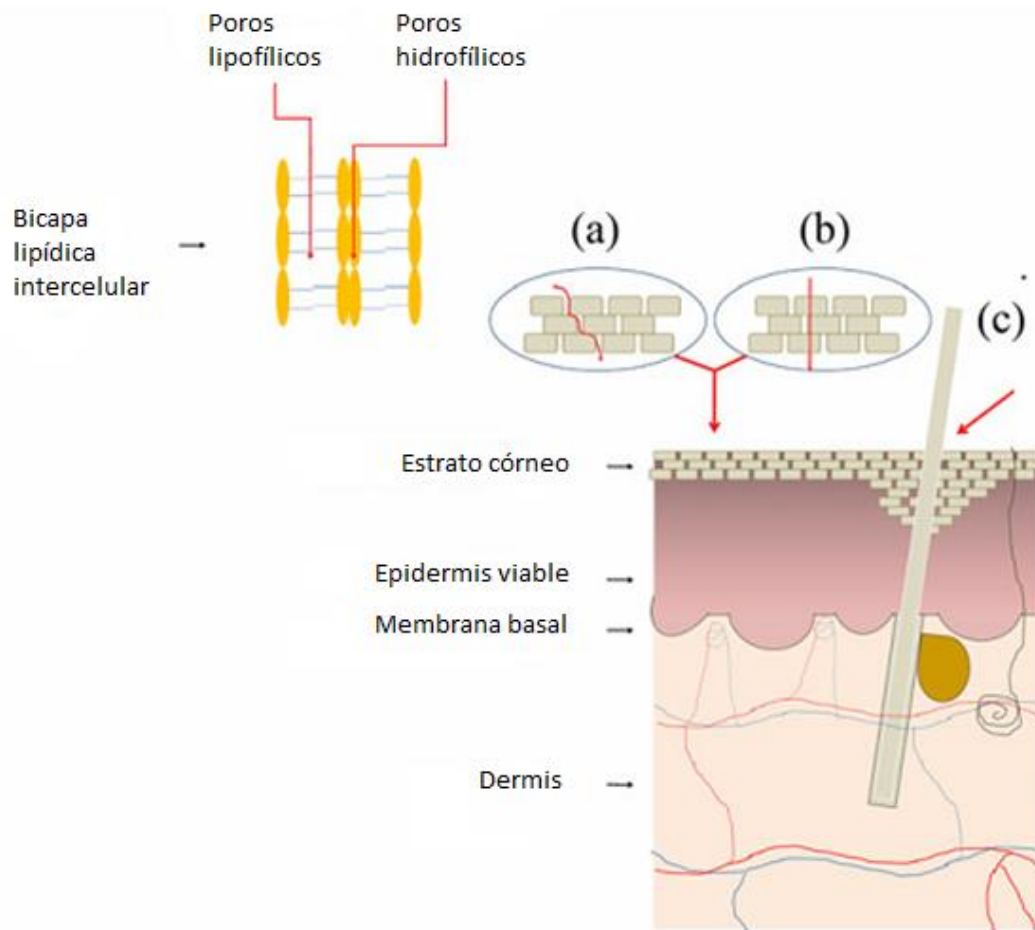


Figura 6. Mecanismos de transporte a través de la piel, a) intercelular, b) transcelular y c) folículos pilosos (7).

3. Interacción de las nanopartículas lipídicas con la piel

Las nanopartículas basadas en sistemas lipídicos son el tipo más común de nanopartículas estudiadas para la aplicación tópica de sustancias (7).

Un importante factor a tomar en cuenta al desarrollar productos destinados para su aplicación tópica está relacionado con los efectos que estos pueden tener sobre la hidratación de la piel y su viscoelasticidad. Estos efectos pueden verse influenciados tanto por el vehículo como por el mismo ingrediente activo. Se ha observado que las SLN presentan un efecto oclusivo *in vitro* que es variable según el tamaño de las partículas, su estado cristalino y la concentración del lípido, esto debido a el hecho de que las SLN forman una capa al secarse con lo que se disminuye la evaporación de agua desde la piel (20).

A partir de diferentes estudios se sabe que son varios los factores que influyen en la penetración de las nanopartículas en la piel (Figura 7). Entre estos se encuentran las características fisicoquímicas de las nanopartículas (tamaño, forma, carga superficial, composición química), los factores atribuidos a la formulación (estado físico, vehículo), y factores experimentales (concentración, dosis y tiempo de exposición de las nanopartículas) (3).

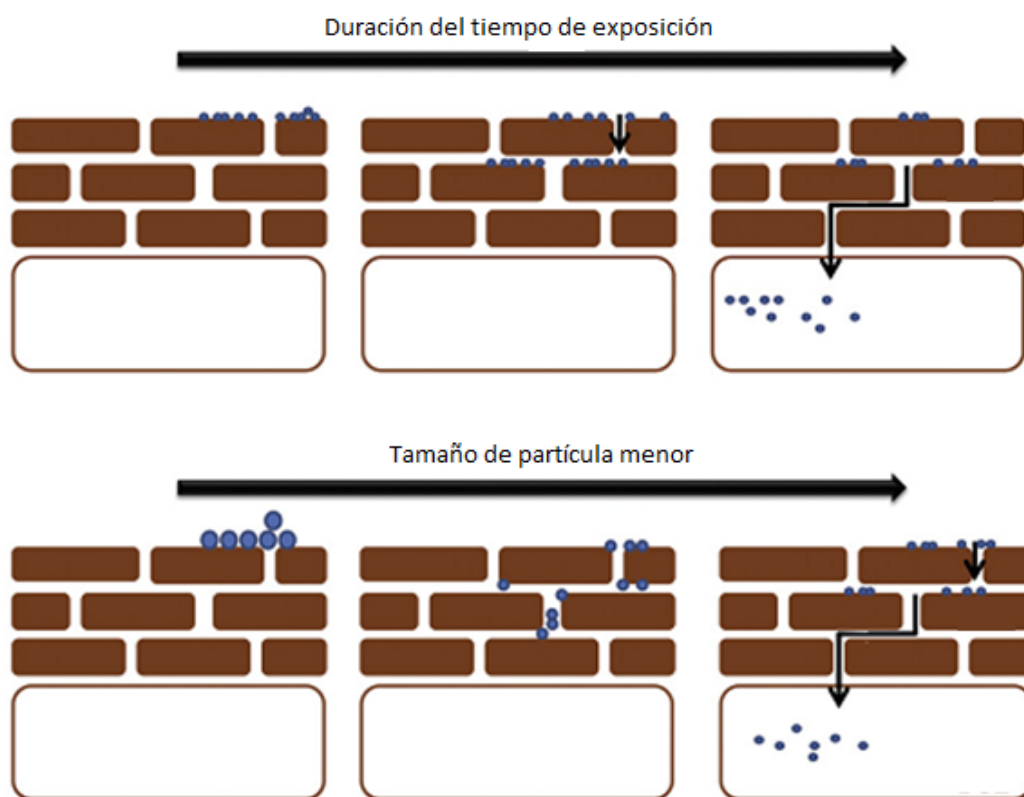


Figura 7. Esquema que representa el efecto del tiempo de exposición y tamaño de partícula sobre la penetración. Se ha observado que a mayor tiempo de exposición, y a menor tamaño de partícula, el grado de penetración será mayor (3).

4. Aplicaciones de las nanopartículas lipídicas para administración tópica

4.1. Aplicaciones farmacéuticas

Las SLN presentan muchas características que las hacen ideales para la aplicación tópica de fármacos. Por su pequeño tamaño, las SLN son capaces de interactuar con el EC y de esta manera incrementan la penetración de los fármacos hacia la piel. Además se puede lograr liberación sostenida a partir de las SLN al mismo tiempo que se evita la absorción sistémica. Para obtener una forma de dosificación tópica que tenga la consistencia semisólida deseada, las dispersiones de SLN se pueden incorporar en cremas o hidrogeles de uso común (21).

4.2. Aplicaciones cosméticas

Comparando las formulaciones de nanopartículas lipídicas para aplicación tópica en el campo farmacéutico y el cosmético, la diferencia es mínima en cuanto a los aspectos tecnológicos (incorporación de los activos, incorporación de las nanopartículas en cremas, estabilidad de las cremas, etc.); sin embargo, el tiempo de desarrollo del producto y su introducción al mercado es mucho más corto en el caso de productos cosméticos (4).

Las SLN representan un prometedor sistema acarreador para activos cosméticos gracias a sus ventajas sobre otras formulaciones convencionales (22):

- Protegen compuestos lábiles contra la degradación química, por ejemplo retinol y tocoferol.
- Posibilidad de liberación controlada de los ingredientes activos. Las SLN que tienen una capa externa enriquecida con el activo mostrarán características de liberación con efecto “burst” mientras que las SLN que están enriquecidas en el núcleo presentarán liberación sostenida.
- Las SLN actúan como agentes oclusivos, es decir, se pueden usar para lograr incrementar el contenido de agua en la piel.
- Las SLN muestran potencial como bloqueadores de rayos UV ya que actúan como barrera física por sí solas y además se pueden combinar con otras moléculas bloqueadoras para alcanzar un mejor efecto fotoprotector.

4.3. Referencias de aplicaciones de las nanopartículas lipídicas para administración tópica.

La Tabla 1 enlista algunas aplicaciones publicadas en artículos, tanto farmacéuticas como cosméticas, que se le han dado a las SLN y los NLC. Se mencionan los componentes de los sistemas, el método de preparación empleado, el activo encapsulado y su potencial aplicación.

Tabla 1. Aplicaciones de las SLN y los NLC para administración tópica.

Sistema	Componentes Lípidos/estabilizante	Método de preparación	Fármaco/activo Aplicación	Referencia
SLN	Precirol ATO 5/Tween 80	HPH* en caliente	Isotretinoína Tratamiento de acné	(23)
NLC	Cetilpalmitato/Miglyol 812/TegoCare 450	HPH en caliente	Coenzima Q10 Antioxidante para reducir los daños causados por el estrés oxidativo	(24)
SLN	Cetil palmitato/Plantacare 810	HPH	Luteína Antioxidante para protección de la piel contra el foto daño	(25)
NLC	Cetil palmitato/triglicéridos cáprico- caprílico/Plantacare 810			
NLC	Palmitato de isopropilo/Glicéridos hidrogenados/Span40, Tween 80	HPH	Carotenoides Preservación de estos agentes de uso cosmético y farmacéutico	(26)
SLN	Triglicéridos semisintéticos/mezcla de polisorbato y oleato de sorbitan	—	Minoxidil Tratamiento de la alopecia androgénica	(27)
SLN	Miristato de miristilo/Pluronic F68	HPH en caliente	Tretinoína Tratamiento tópico de acné, fotoenvejecimiento y psoriasis	(28)
NLC	Dibehenato de glicerilo/Triglicéridos cáprico-caprílico/Lecitina	HPH en caliente	Flurbiprofeno Antiinflamatorio para el tratamiento de la gota, artritis reumatoide, osteoartritis y quemaduras solares	(29)
SLN	Cetil palmitato/éteres de polioxi-etileno	Temperatura de inversión de fases	Idebenona Antioxidante para el tratamiento de los daños causados por la oxidación en la piel	(14)
NLC	Cetil palmitato/ácido caprílico/Tween 80 (propilenglicol)	Microemulsión	Meloxicam Tratamiento sintomático de artritis reumatoide y osteoartritis	(30)

SLN	Dibehenato de glicerilo/Tween 20, DOSS	Ultrasonido	Quercetina Antioxidante para prevenir los efectos del estrés oxidativo en la piel.	(31)
NLC	Dibehenato de glicerilo/ácido oleico/Tween 20, DOSS			
SLN	Dibehenato de glicerilo o palmitostearato de glicerilo/Pluronic F-127	Inyección de disolvente	Clorhidrato de terbinafina Tratamiento de infecciones fúngicas en la piel.	(21)
NLC	Dibehenato de glicerilo/Triglicéridos cáprico-caprílico/Lutrol® F-68	Ultrasonido	EHT, OMC, DHHB, Tinosorb S o Avobenzon Filtros solares	(32)

HPH: Homogenización a alta presión, DOSS: dioctil sulfosuccinato sódico, EHT: etilhexil triasona, OMC: octil metoxicinamato, DHHB: dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato.

También existen patentes que reportan preparaciones con SLN o NLC para aplicación tópica de activos cosméticos:

- Crema humectante con SLN: Una crema humectante que contiene glicerol, ciclometicona DC 345, agentes preservadores, activos biológicos y agua. Los activos biológicos se incluyen como una dispersión de SLN de tamaño 50 – 300 nm que contienen agua, cera de carnauba, benzofenoid-3 (filtro UV), decilglucosida, aceite de grosella, y polietilenglicol como estabilizante. La invención produce un efecto intenso de humectación y nutrición en la piel, además de que mejora la elasticidad de la piel (33).
- Composiciones para la liberación controlada de fragancias: Preparaciones para lograr una liberación localizada y/o modificada de fragancias a la vez que se previene su oxidación. Las aromas se incluyen en forma de una dispersión de SLN y la liberación de las fragancias depende de su localización en las SLN así como de los puntos de fusión de los lípidos empleados (34).
- Formulación de protección UV: SLN que contienen filtros UV liposolubles con el fin de incrementar su solubilidad. Las preparaciones contienen filtro UV liposoluble (1-40%), lípido sólido (20-98.9%), emulsificante (0.1-20%) y lípido líquido (0-40%). Una ventaja de la incorporación de los filtros UV en las SLN es que la penetración a través de la piel se ve reducida lo cual es un factor positivo para prevenir efectos tóxicos (35).
- Sanitizantes: Preparaciones germicidas para aplicación tópica que produce una sanitización de la piel a la vez que aporta beneficios a la superficie dérmica. La composición consiste de un alcohol monohídrico (50%), agua y SLN. Un constituyente esencial de esta invención son las SLN las cuales son compatibles con el alto contenido

alcohólico. Las nanopartículas empleadas consisten en ceramidas, colesterol, fosfolípidos, coenzima Q10, fitoesterol, luteína, Vitamina E y Vitamina A (36).

La Tabla 2 resume algunos productos ya existentes en el mercado cosmético que contienen SLN o NLC.

Tabla 2. Productos en el mercado a base de SLN y NLC (37).

Productor/ distribuidor	Productos	Introducción al mercado	Ingredientes activos
Dr. Rimpler	Cutanova Cream Nano Repair Q10 Intensive Serum NanoRepair Q10 Cutanova Cream NanoVital Q10	2005-2006	Coenzima Q10, polipéptidos, extracto de hibiscus, extracto de jengibre, ácido oleanólico, ácido ursólico
Isabelle Lancray	SURMER Crème Légère Nano- Protection SURMER Crème Riche Nano- Restructurante SURMER Elixir du Beauté Nano- Vitalisant SURMER Masque Crème Nano- Hydratant	2006	Aceite de nuez de kukui, pseudopéptido, extracto de leche de coco, extracto de noni
Dr. Kurt Richter	Nanolipid Q10 CLR Nanolipid Basic CLR NanoLipid Repair CLR	2006-2007	Coenzima Q10, aceite de semilla de grosella negra, triglicéridos cáprico/caprílico
Amore Pacific	IOPE SuperVital	2006	Coenzima Q10, ácidos grasos insaturados
Beate Johnen	Cream, Serum Eye cream Extra moist softener Extra moist emulsion NLC Deep Effect Eye Serum	2006	Coenzima Q10, oligosacáridos altamente activos
Scholl	Scholl	2007	Aceite de semilla de macadamia, aceite de aguacate, urea, aceite de semilla de grosella negra
La prairie	Swiss Cellular White Illuminating Eye Essence	2007	Glicoproteínas, extracto de raíz de jengibre, extracto de hoja de <i>camelia sinensis</i> , extracto de violeta tricolor
Dr. Theiss	Olivenöl Anti Falten Pflege konzentrat Olivenöl Augenpflegebalsam	2008	Aceite de olea europaea, pantenol, proteína de leche hidrolizada, extracto de raíz de rosea, cafeína

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de las SLN y los NLC sobre las propiedades de barrera de la piel mediante pruebas de oclusión *in vitro*, pérdida de agua transepidermal y penetración, para poder definir y caracterizar el desempeño de estos sistemas.

Objetivos particulares

- Definir las condiciones de preparación de las nanopartículas lipídicas por el método de homogenización a alto cizallamiento evaluando diferentes estabilizantes, tiempo de agitación y el efecto de la sonicación.
- Preparar SLN y NLC a base de dibehenato de glicerilo mediante el método de homogenización a alto cizallamiento y caracterizarlas en cuanto a tamaño de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta y morfología.
- Evaluar la estabilidad de SLN y NLC sometidos a diferentes condiciones de humedad y temperatura mediante la determinación del tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta en diferentes lapsos de tiempo durante 3 meses.
- Estudiar el efecto oclusivo *in vitro* mediante la prueba de oclusión según De Vringer y TEWL en piel de cerdo, para contrastar los resultados obtenidos con ambas pruebas.
- Determinar la distancia de penetración de las SLN y los NLC, así como la cantidad máxima que penetra en el EC mediante la cuantificación del colorante rojo de nilo incluido en las mismas como marcador, empleando la técnica de tape stripping.

HIPÓTESIS

La composición de las SLN y los NLC determinará el efecto que estos sistemas presenten sobre las propiedades de barrera de la piel, el cual se verá reflejado en los resultados de las pruebas de oclusión y de penetración a través del estrato córneo.

METODOLOGÍA

1. Materiales

1.1. Equipo

- Balanza analítica BBC32 (BOECO, Germany)
- Ultra-Turrax® T18 basic (IKA®, Germany)
- Parrilla con agitador magnético (Barnstead/Thermolyne, USA)
- Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern Instruments, USA)
- Rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Germany)
- Celdas de permeación tipo Franz modificadas, área de exposición 0.63 cm²
- Celdas de permeación tipo Franz modificadas, área de exposición 3.14 cm²
- Dermatomo eléctrico (Zimmer®, USA)
- Tewameter® TM 210 (Corage-Khazaka, Germany)
- Microbalanza (E. Mettler, Zürich)
- Agitador magnético multiplazas RO15 (IKA®, USA)
- Baño de agua (Polyscience, USA)
- Recirculador de líquidos con termostato (VWR Scientific, USA)
- Espectrofotómetro UV-Visible Cary50 (Varian, Australia)

1.2. Reactivos

- Compritol® 888 ATO (Gattefossé, Francia) Donación de Químicos Lyontec S. de R.L. de C.V.
- Triglicéridos cáprico/caprílico (Droguería Cosmopolita, México)
- Lutrol® F-68 (BASF, Germany)
- Mowiol® 4-88 (Sigma-Aldrich, USA)
- Rojo de Nilo (Sigma-Aldrich, USA)
- Metanol (J. T. Baker, México)
- Fosfato monobásico de potasio (Fermont, México)
- Hidróxido de sodio (Fermont, México)
- Agua obtenida de un sistema Milli-Q® (MILLIPORE, Alemania)

1.3. Material biológico

Orejas de cerdo obtenidas directamente del rastro antes de ser sometidas a tratamiento con agua caliente o vapor.

2. Procedimiento

2.1. Determinación de las condiciones de preparación de las nanopartículas

Las pruebas para determinar las condiciones de preparación empleando el método de homogenización a alto cizallamiento (Ultra-Turrax® T18 basic) se realizaron para las SLN, comparando el tamaño de partícula obtenido con diferentes condiciones para las variables estabilizante, tiempo de agitación y sonicación.

- Estabilizante: Se probaron dos diferentes estabilizantes, Mowiol® 4-88 (alcohol polivinílico) y Lutrol® F-68 (poloxámero 188) a 20,000 rpm por 1 min, 90°C y concentración de lípido del 2.5% p/p.
- Tiempo de agitación: Con el Lutrol® F-68 se evaluó el efecto del tiempo de homogenización, a los 1, 2, 3, 4 y 5 min.
- Se analizó el efecto de la sonicación durante el enfriamiento de las nanopartículas, posterior a la agitación con el homogenizador y empleando diferentes tiempos: 0, 5 y 10 min.

Finalmente, se prepararon NLC bajo las condiciones óptimas obtenidas para las SLN, empleando tres diferentes proporciones de lípido sólido/lípido líquido (dibehenato de glicerilo y triglicéridos cáprico/caprílico respectivamente): 85:15, 90:10 y 95:5. Se evaluó el efecto de la composición sobre el tamaño de partícula.

En la Figura 8 se ilustra el procedimiento empleado para preparar las SLN y los NLC.

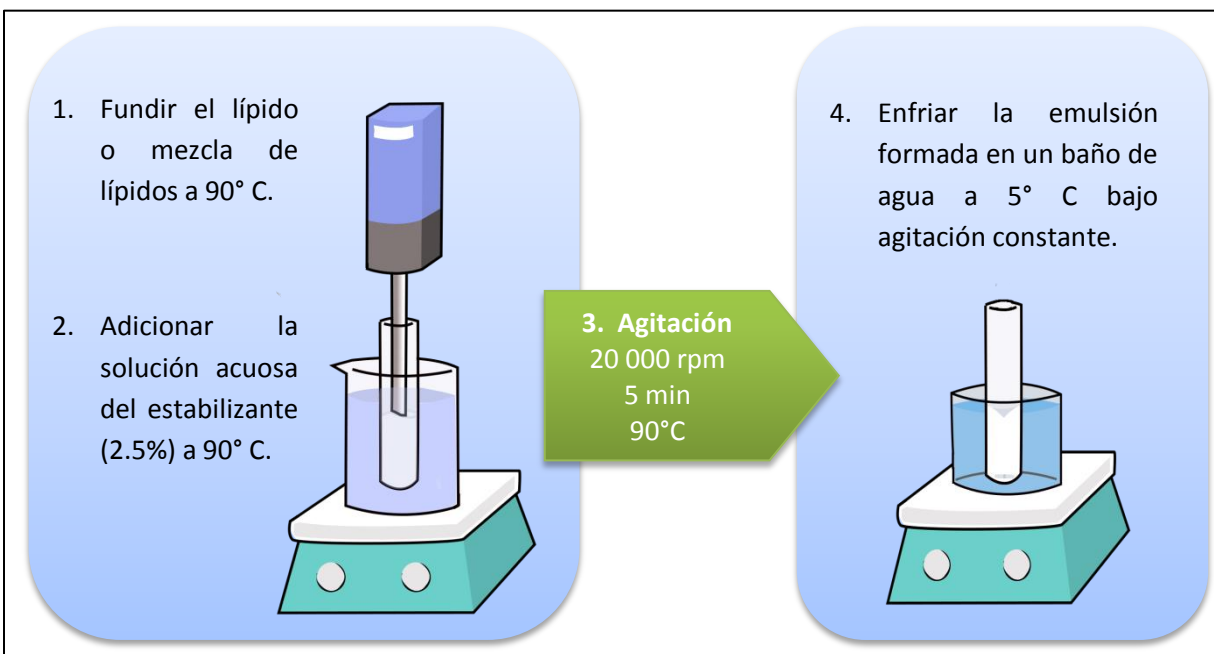


Figura 8. Esquema que representa el proceso de preparación de los SLN o NLC por el método optimizado de homogenización a alto cizallamiento.

2.2. Caracterización de las nanopartículas

2.2.1. Tamaño de partícula e índice de polidispersión

El tamaño de partícula e índice de polidispersión de las SLN y los NLC se determinó por dispersión dinámica de luz usando un Zetasizer Nano-ZS90 Malvern. Las muestras se diluyeron con agua destilada y se colocó 1 mL en una celda de vidrio de apertura cuadrada (Figura 9a). El índice de polidispersión se midió para estudiar la distribución del tamaño de partícula. Las condiciones empleadas fueron 25°C y un ángulo de 90°. Para la caracterización de las nanopartículas, el análisis de cada muestra se realizó por quintuplicado.

2.2.2. Potencial Z

El potencial zeta se midió empleando un Zetasizer Nano-ZS90 Malvern. Las muestras se diluyeron con agua desionizada y se colocaron en una celda de potencial zeta (Figura 9b). Se consideraron los valores de viscosidad, índice de refracción y constante dieléctrica del agua a 25°C. Para la caracterización de las nanopartículas, el análisis de cada muestra se realizó por quintuplicado.

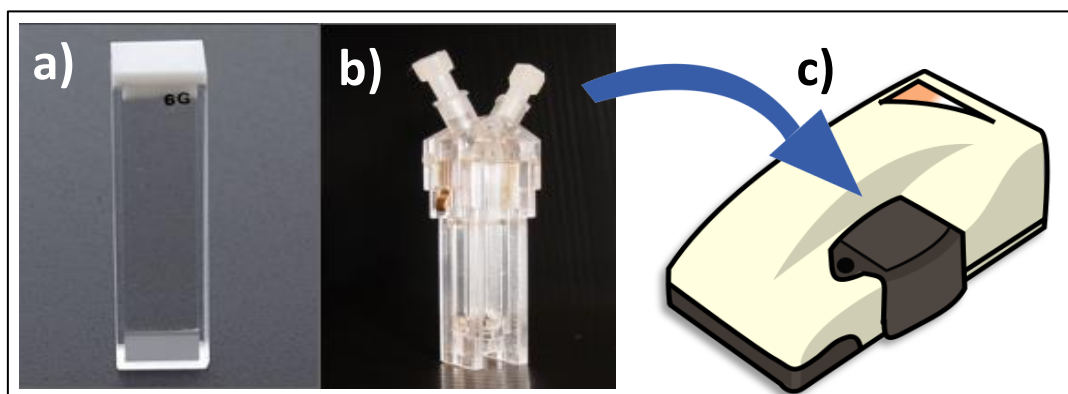


Figura 9. a) celda de vidrio de apertura cuadrada, b) la celda de potencial Z y c) Zetasizer Nano-ZS90 Malvern.

2.2.3. Morfología

Se empleó la microscopía electrónica de barrido (MEB) para observar la morfología de las SLN y los NLC. Se colocó sobre un cubreobjetos una gota de suspensión de las nanopartículas, se dejó secar y se le dio un recubrimiento con oro. Las nanopartículas se observaron a un aumento de 10,000x.

2.3. Prueba de estabilidad

La estabilidad física de las dispersiones de SLN y NLC se evaluó examinando los cambios en el tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z durante el almacenamiento bajo tres diferentes condiciones de humedad y temperatura:

- 5°C, 40% HR (La HR corresponde al valor registrado dentro de la cámara)
- 25°C, 65% HR (La HR se mantuvo con una solución saturada de $Mg(NO_3)_2$)
- 40°C, 75% HR (La HR se mantuvo con una solución saturada de NaCl)

Las muestras se conservaron en viales de vidrio. El tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial Z se midió por triplicado a los días 0, 8, 15, 30, 60 y 90 siguiendo los procedimientos descritos anteriormente. Se realizó un ANOVA para determinar si es significativo el efecto de los factores tiempo y condición sobre los parámetros medidos (tamaño de partícula, IP y potencial Z).

2.4. Prueba de oclusión *in vitro*

NOTA: Para las pruebas de oclusión *in vitro* y permeación se empleó una suspensión concentrada de nanopartículas lipídicas la cual se obtuvo evaporando el agua con un rotavapor hasta llegar a una concentración de 10% de lípido en las suspensiones.

Se evaluaron las propiedades oclusivas de las SLN y los NLC mediante el método de De Vringer modificado (38). La prueba se esquematiza en la Figura 10.

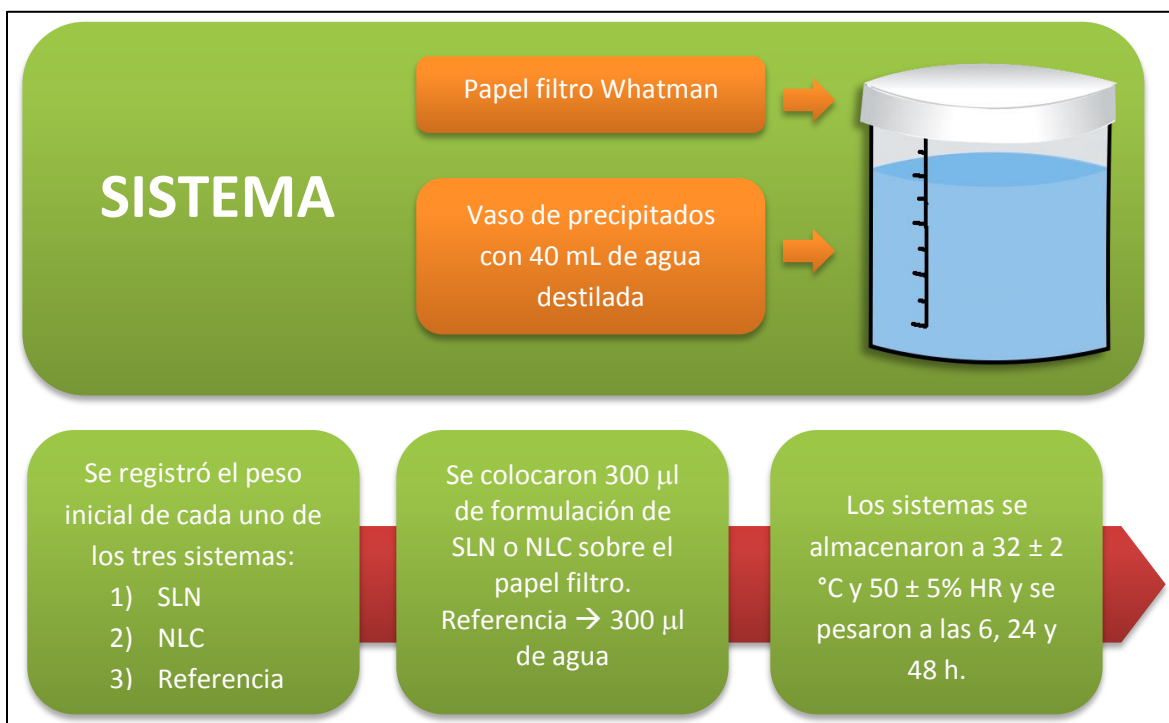


Figura 10. Prueba de oclusión *in vitro* por el método de De Vringer modificado.

Con los datos de los pesos se calculó el factor de oclusión (F) a las 6, 24 y 48 h mediante la siguiente ecuación:

$$F = \frac{A - B}{A} \times 100$$

Donde: A → Pérdida de agua de la referencia al tiempo t

B → Pérdida de agua del sistema tratado con SLN o NLC al tiempo t

Para confirmar la formación de una película sobre el papel filtro se realizó MEB sobre el papel filtro solo y el papel filtro tratado con SLN o NLC. Los aumentos observados fueron 45x, 100x y 1000x.

2.5. Pérdida de agua transepidermal en piel de cerdo

Con esta prueba se estudió la capacidad de las SLN y los NLC para reducir la pérdida de agua transepidermal (TEWL) empleando piel de cerdo intacta y piel de cerdo sin EC. Para retirar el EC se empleó la técnica de tape stripping sobre la piel de cerdo. A continuación (Figura 11) se ilustra el procedimiento empleado para evaluar la TEWL.

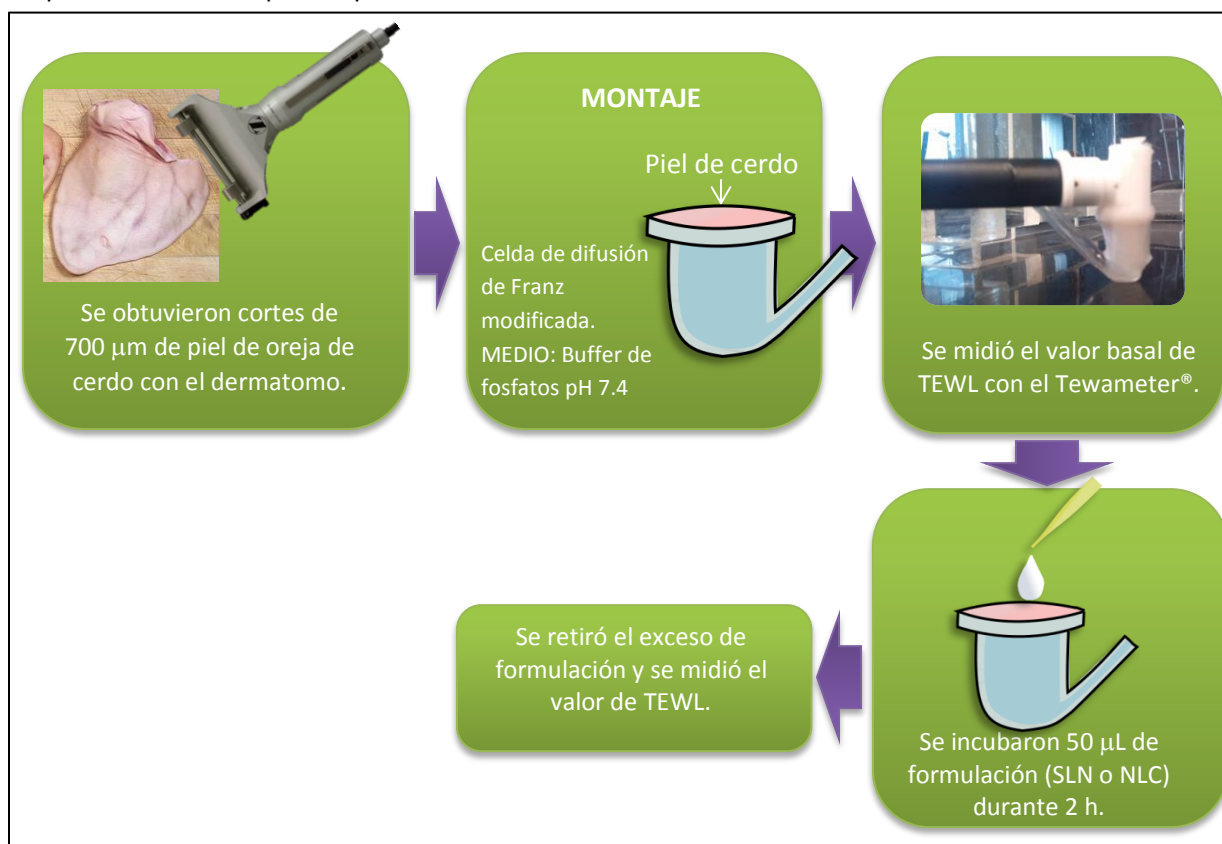


Figura 11. Metodología aplicada para determinar pérdida de agua transepidermal (TEWL) en piel de cerdo.

A partir de estos datos de TEWL basal y TEWL después del tratamiento con SLN o NLC se calculó la reducción del valor de TEWL en porcentaje.

Para confirmar el fenómeno de formación de película sobre la piel de cerdo intacta y sin EC se realizó MEB. Los cuatro pasos para la preparación de muestras biológicas para la MEB son la fijación, deshidratación, secado y recubrimiento, los cuales nos permiten mantener la integridad estructural de la muestra (39). En este caso, la piel se deshidrató haciéndola pasar por soluciones acuosas de etanol de concentraciones crecientes (30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%) hasta llegar a etanol absoluto para después secarlas mediante un tratamiento con CO₂. Una vez que la piel se encontraba deshidratada, se procedió a tratarla con las formulaciones de SLN y NLC, aplicando y

extendiendo una gota de suspensión de nanopartículas para formar una delgada capa. Por último y una vez que la capa se dejaba secar, se realizó un recubrimiento con oro. Los aumentos observados fueron 45x, 100x y 1000x.

2.6. Estudio de penetración en piel de cerdo

Con esta prueba se analizó la capacidad de las SLN y los NLC para penetrar a través de las capas celulares que conforman el EC. Para este objetivo se requirió incluir un marcador en las nanopartículas lipídicas y así correlacionar la cantidad de marcador cuantificada en cada capa con la cantidad de nanopartículas penetradas.

2.6.1. Nanopartículas lipídicas con rojo de nilo

Se incluyó el colorante liposoluble rojo de nilo como marcador en las SLN y los NLC. Para preparar estas nanopartículas se empleó el método de homogenización a alto cizallamiento bajo las condiciones establecidas anteriormente. La composición de los sistemas se mantuvo de la misma manera y solo se incluyó el rojo de nilo en una proporción de 0.005% p/p. De la misma manera se procedió a concentrar las suspensiones de nanopartículas, empleando el rotavapor, hasta alcanzar un 10% de contenido de lípido.

2.6.2. Curva de calibración de rojo de Nilo

La cuantificación del rojo de nilo se llevó a cabo por espectrofotometría UV/Visible. Como medio de disolución se empleó metanol en contacto con cintas adhesivas conteniendo EC, obtenido de la siguiente manera:

- Se realizó tape stripping sobre la piel de oreja de cerdo con cintas de 4 x 5 cm (20 cm²). Se empleó la cinta "Packaging tape, Scotch®".
- En una misma zona se realizaron 15 strippings, y las cintas obtenidas se pusieron a extraer en metanol durante 24 h, manteniendo la relación de 5 mL de metanol por cada cinta de 20 cm².
- Transcurrido el tiempo, el medio se filtró para eliminar los restos del EC que no se solubilizaron en el metanol.

Las soluciones de rojo de nilo se prepararon con este medio y las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de máxima absorción (λ_{max}) de 555nm previamente determinada mediante un barrido.

2.6.3. Penetración de las nanopartículas lipídicas en la piel de cerdo

La Figura 12 esquematiza la metodología seguida para el estudio de penetración de las nanopartículas lipídicas a través de la piel de cerdo *in vitro*, empleando celdas tipo Franz.

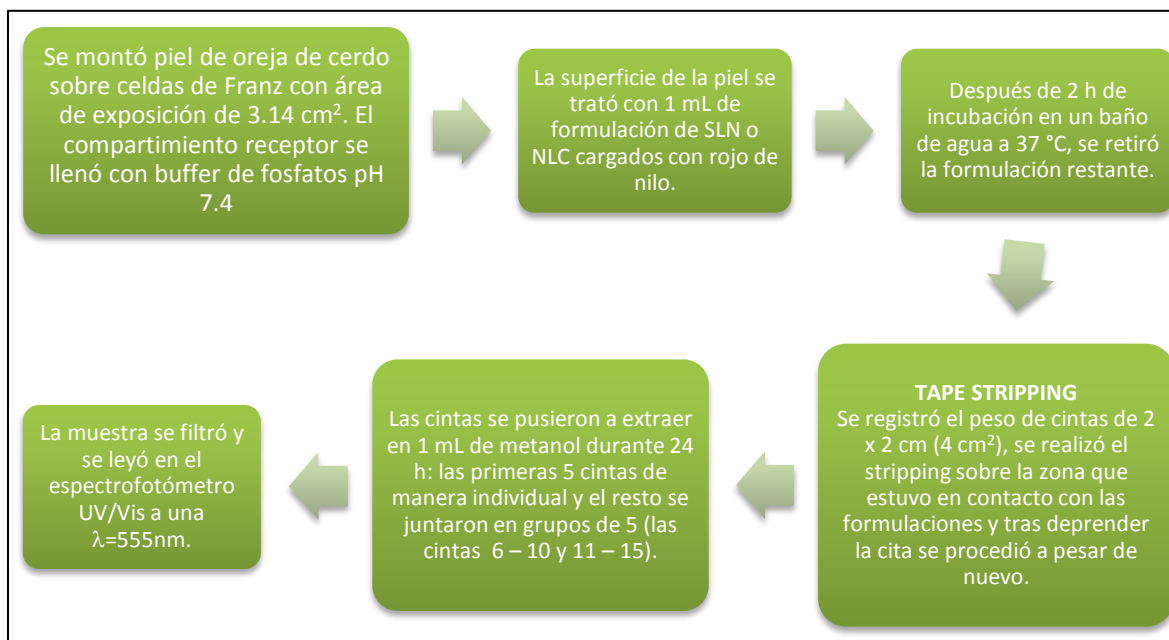


Figura 12. Metodología aplicada para estudiar la penetración de las nanopartículas lipídicas

2.6.4. Cálculo de la distancia de penetración y la cantidad de rojo de nilo penetrada.

La distancia de penetración se calculó con los pesos iniciales y los pesos después de realizar el stripping para cada cinta, empleando las siguientes fórmulas:

$$\text{Peso del EC (PEC)} = \text{Peso final de la cinta} - \text{Peso inicial de la cinta}$$

$$\text{Distancia de penetración} = \frac{PEC}{\rho_{EC} \times A}$$

Donde PEC → expresado en gramos.

ρ_{EC} → densidad del EC. Se toma como 1g/cm^3 .

A → Área de la cinta. En este caso fue de 4cm^2 .

La cantidad de rojo de nilo en μg se calculó a partir del valor de absorbancia, el cual se interpoló en la curva de calibración realizada para conocer la concentración en el volumen empleado para hacer la extracción. Al multiplicar la concentración por el volumen (1 mL) se obtiene la cantidad de rojo de nilo por cinta.

2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico correspondiente se realizó con el software STATGRAPHICS® Centurion XVI. Los resultados arrojados de las comparaciones entre medias, ANOVA's y pruebas de rangos múltiples de Tukey se reportan en la sección de anexos (Anexos II, III, IV, V y VII).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

1. Determinación de las condiciones de preparación de las nanopartículas lipídicas.

Como se mencionó en el marco teórico, la HPH es el método más empleado para la preparación de nanopartículas lipídicas, sin embargo, la homogenización a alto cizallamiento es una alternativa apropiada para la producción de nanopartículas lipídicas a escala laboratorio al ser un método sencillo y requerir aparatos de relativamente bajo costo. Esta técnica se basa en la preparación de una emulsión, es decir, una mezcla heterogénea de dos líquidos inmiscibles entre sí. En este caso se busca dispersar la fase lipídica, que consiste en el lípido fundido o mezcla de lípidos, en una fase acuosa compuesta por la solución del estabilizante. El homogenizador tipo rotor estator (Ultra-Turrax®) nos imprime la energía necesaria para lograr la dispersión de una fase en otra gracias al principio bajo el cual funciona: “debido al elevado número de revoluciones del rotor, el medio a procesar se aspira axialmente y de modo automático en el cabezal de dispersión y a continuación se presiona radialmente a través de las ranuras del conjunto rotor/estator. Por las grandes fuerzas de aceleración, el material está sometido a unos esfuerzos de cizallamiento y empuje muy intensos. En la rendija de cizallamiento existente entre el rotor y el estator aparece adicionalmente una gran turbulencia que conduce a una mezcla óptima de la suspensión” (40)

Se probaron dos diferentes estabilizantes poliméricos, poloxámero 188 (Lutrol® F-68) y alcohol polivinílico (PVA, Mowiol® 4-88). Kovacevic y colaboradores reportan que los estabilizantes poliméricos son recomendables cuando se piensa en una administración dérmica ya que, debido a su naturaleza, es menos probable que penetren más allá del EC y por lo tanto, que causen irritación en la piel (41).

Se encontró que con el PVA solo se producían micropartículas, mientras que con el poloxámero 188 si se lograron obtener nanopartículas (Tabla 3).

Tabla 3. Tamaño de partícula obtenido con diferentes estabilizantes por el método de homogenización a alto cizallamiento (20,000 rpm, 1 min, 90°C). El resultado se expresa como la media \pm DE (n=6).

Estabilizante	Tamaño de partícula (nm)
Mowiol® 4-88	2048 \pm 70
Lutrol® F-68	394 \pm 25

El tiempo de agitación influye significativamente ($p=0.0113$) sobre el tamaño de partícula de tal manera que al incrementar el tiempo, el tamaño disminuyó. En la Figura 13 se observa que con 2 minutos el tamaño se ve disminuido en un 34% con respecto al tamaño obtenido con solo 1 minuto de agitación, mientras que con 4 y 5 minutos se alcanza un 50% en la reducción del tamaño de partícula. Al comparar el tamaño obtenido con tiempos de agitación 1 y 5 minutos (Tabla 4) se tiene que el tamaño de partícula se reduce de una manera significativa al aumentar el tiempo de agitación ($p=0.0081$). El efecto del tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula empleando el método de homogenización a alto cizallamiento se explica por la turbulencia

generada, la cual hace que los glóbulos formados recirculen varias veces a través del rotor-estator. La reducción del tamaño de glóbulo se presenta hasta cierto tiempo, hasta llegar al punto en el que ya no es posible que siga disminuyendo.

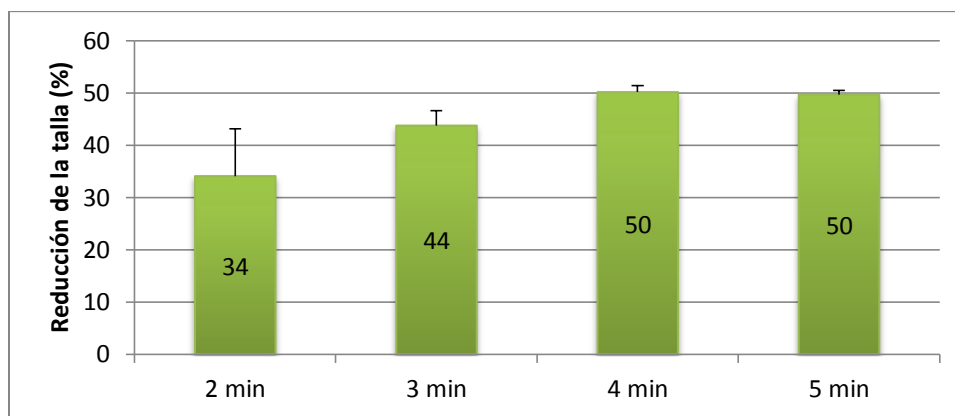


Figura 13. Gráfico de la reducción en porcentaje del tamaño de partícula de las SLN en función del tiempo de agitación (20,000 rpm, Lutrol® F-68). Cada barra representa la media (n=3) con su respectiva barra de DE.

Tabla 4. Tamaño de partícula obtenido con tiempos de agitación 1 y 5 min (20,000 rpm, Lutrol® F-68). El resultado se expresa como la media \pm DE.

Tiempo de agitación (min)	Tamaño de partícula (nm)
1	394 \pm 25 (n=6)
5	200 \pm 6 (n=5)

Se aplicó sonicación a los sistemas durante el enfriamiento de las emulsiones formadas por homogenización a alto cizallamiento con el fin de lograr una reducción en el tamaño de las nanopartículas lipídicas resultantes. Sin embargo, de acuerdo a los resultados (Tabla 5), el efecto obtenido no fue el esperado. La sonicación ocasionó un aumento en el tamaño de las SLN, siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p < 0.05$). Esto se puede deber a que la sonicación aumenta el movimiento de los glóbulos formados ocasionando que aumente la probabilidad de que estos se encuentren y coalescan antes de que el sistema alcance la temperatura del punto de solidificación y se formen las SLN. Aunque se observa que el IP disminuye significativamente al aumentar el tiempo de sonicación ($p < 0.05$), se prefiere evitar el aumento en la talla de las nanopartículas por lo que se decidió omitir el uso de la sonicación durante el enfriamiento de los sistemas.

Tabla 5. Tamaño de partícula e IP obtenido tras aplicar sonicación en diferentes tiempos. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=5).

Tiempo de sonicación (min)	Tamaño de partícula (nm)	IP
0	200 \pm 6	0.436 \pm 0.022
5	259 \pm 8	0.340 \pm 0.008
10	258 \pm 10	0.310 \pm 0.010

Para la preparación de los NLC se determinó en primera instancia la proporción de lípido líquido (triglicéridos cáprico/caprílico) a emplear, ya que posiblemente este factor pudiera tener un impacto sobre el tamaño de partícula. Se encontró (Tabla 6) que el tamaño de partícula resultante variaba según la proporción de lípidos empleada ($p= 0.187$), ya que se produjo un incremento estadísticamente significativo en el tamaño de partícula al emplear una proporción de lípido sólido/lípido líquido de 85:15 en comparación con las de 90:10 y 95:5 (95% Tukey). Entre estas últimas no existe diferencia significativa en cuanto al tamaño de partícula obtenido. En un estudio realizado sobre la influencia del contenido de aceite (triglicéridos cáprico/caprílico) en el tamaño de los NLC producidos (38), se reporta que la carga de aceite no tiene un efecto significativo sobre el tamaño de partícula de los NLC y que el tamaño de partícula de las nanopartículas lipídicas usualmente depende de otros factores como el tipo y concentración de los lípidos y surfactantes empleados. Para este trabajo, donde se estudiaron 3 proporciones para sistemas compuestos por dibehenato de glicerilo y triglicéridos cáprico/caprílico, se encontró que el tamaño de partícula obtenido entre la proporción 90:10 y 95:5 no fue diferente estadísticamente, mientras que al emplear la proporción 85:15 el tamaño sí aumenta de manera significativa aunque la magnitud de este incremento no fue muy grande. En este caso sería necesario probar el efecto de otras proporciones (e.g., 80:20, 75:25) con el fin de comprobar si efectivamente el contenido de lípido para estos sistemas tiene un efecto sobre el tamaño de partícula de los NLC.

Tabla 6. Tamaño de partícula de los NLC según la proporción de lípido sólido/lípido líquido empleada. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=3).

Proporción lípido sólido/lípido líquido	Tamaño de partícula (nm)
85:15	211 \pm 4
90:10	192 \pm 10
95:5	189 \pm 6

A partir de los resultados de las pruebas realizadas se estableció que las condiciones para la preparación de las SLN y los NLC fueran las siguientes:

Estabilizante	Lutrol® F-68 (Poloxámero 188) al 2.5%
Contenido de lípido	2.5%
Velocidad y tiempo de agitación	20,000 rpm, 5 min
Temperatura	90°C
Enfriamiento	5°C, sin sonicación
NLC, lípido sólido/lípido líquido	90:10

2. Caracterización de las nanopartículas lipídicas

Se buscó que los dos sistemas fueran similares en cuanto a sus características fisicoquímicas con el fin de que la inclusión del aceite fuera la variable a estudiar con relación al efecto que estos sistemas producen sobre las propiedades de barrera de la piel. Por tal razón se evitó que existiera una amplia diferencia en cuanto al tamaño entre las SLN y los NLC que pudiese tener un impacto en los efectos sobre la piel. Las nanopartículas lipídicas obtenidas presentaron las siguientes características de tamaño, IP y potencial Z (Tabla 7):

Tabla 7. Tamaño de partícula, IP y potencial Z de las SLN y los NLC preparados. Los resultados se expresan como la media \pm DE.

	SLN	NLC (90:10)
Tamaño de partícula (nm)	200 \pm 6	192 \pm 11
IP	0.436 \pm 0.022	0.311 \pm 0.014
Potencial Z (mV)	-7.5 \pm 0.6	-11.1 \pm 0.8

El tamaño de partícula fue similar entre las SLN y los NLC, lo cual es favorable para el desarrollo de las pruebas sobre la piel. El IP describe la amplitud de la distribución del tamaño de partícula. Este parámetro puede tomar valores entre 0 y 1 aunque en la bibliografía se considera que un $IP < 2$ es indicativo de una estrecha distribución del tamaño de partícula (42). En la Figura 14 se observa de manera gráfica la distribución del tamaño para las SLN y los NLC, donde se ve que para ambos sistemas existe una pequeña población (no más del 10%) de partículas de tamaño entre 15 - 50 nm, la cual contribuye al valor de IP ya que el software, al calcular este valor, considera todos los tamaños presentes en la muestra. También en este aspecto, el método de preparación elegido influye en el valor de IP obtenido, ya que con este no es posible llegar a una buena homogenización del tamaño de partícula en comparación con la HPH (1).

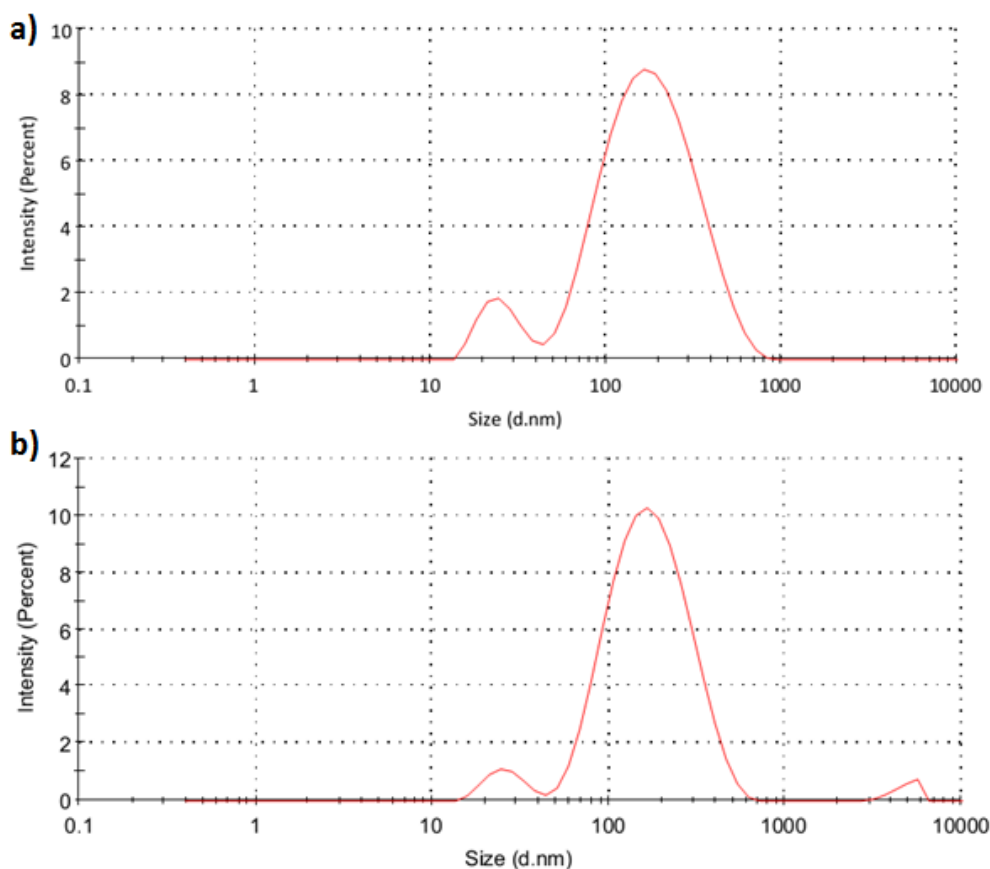


Figura 14. Gráficos de distribución del tamaño de partícula de a)SLN y b)NLC.

El potencial Z es una herramienta útil para predecir la estabilidad de los sistemas coloidales durante el almacenamiento. De manera general se reporta que el valor absoluto de este parámetro debe ser mayor a 30 mV (valor absoluto) para poder asegurar una buena estabilidad física, siendo óptima cuando el potencial Z alcanza valores cercanos a ± 60 mV (43). Entre mayor sea el valor de potencial Z, las fuerzas electrostáticas de repulsión entre las partículas es mayor con lo que se evita agregación de estas. Se sabe que el potencial Z depende de la naturaleza de las nanopartículas y las cargas superficiales así como de la composición del medio en el que se encuentren dispersas. En el caso de las SLN y los NLC preparados, el valor absoluto del potencial Z obtenido es menor a 30 mV (Tabla 7).

En las nanopartículas lipídicas, el potencial zeta depende de la configuración molecular que adquieren los lípidos en la capa exterior de las nanopartículas y de su interacción con los tensoactivos. En este caso, el estabilizante empleado (poloxámero 188) al ser un tensoactivo no iónico, y estar ubicado en la superficie de las partículas, no aporta cargas adicionales que pudieran influir en el potencial Z. Por otro lado, los lípidos que conforman las SLN son una mezcla de acilglicerolos: tribehenato de glicerilo (28-32%), dibehenato de glicerilo (52-54%) y monobehenato de glicerilo (12-18%) (44). Todos ellos son ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena larga (22 C) por lo que estos lípidos no presentan carga ni ninguna polaridad apreciable que contribuya al potencial Z. Los NLC constan de esta misma mezcla de behenatos de glicerilo y de triglicérido cáprico/caprílico, el cual es un diacilglicerol de cadena media (10 y 8 C) (45). En este caso, debido a que el diacilglicerol tiene un grupo hidroxilo sin esterificar y por la corta longitud de las cadenas hidrocarbonadas, este acilglicerol se comporta como una molécula anfipática con cierta polaridad que contribuye en mayor medida al potencial Z. Es por esto que los NLC presentan un mayor potencial Z en comparación con las SLN.

En un artículo publicado sobre la influencia del aceite sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas (38), se observó el mismo fenómeno con respecto al potencial Z para nanopartículas de cetil palmitato que tenían como aceite triglicéridos de cadena mediana. Este evento se explicó por el hecho de que el aceite tiende a acumularse en la superficie de las partículas, ya que, al tener un punto de fusión mucho menor al del lípido sólido, éste último empieza cristalizar en primer lugar al momento de formar los NLC, atrapando algunas porciones de aceite durante el proceso pero que, sin embargo, gran cantidad de éste se acumula en la parte más externa de las nanopartículas.

Por último y como parte de la caracterización de las SLN y los NLC, se observó su morfología mediante imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB). La MEB es una técnica versátil que permite obtener imágenes de muestras de tamaño muy pequeño de una gran diversidad de especímenes para diferentes disciplinas. Las imágenes por MEB se generan por la interacción de un rayo de electrones con la superficie de la muestra, lo que produce señales que contienen información sobre las características y topografía de la superficie de misma (39). La Figura 15 muestra las fotografías obtenidas por MEB de las SLN y los NLC. En la imagen se aprecia

que ambos sistemas constan de partículas de tamaño nanométrico de aproximadamente 200 nm lo cual coincide con los resultados obtenidos sobre el tamaño de partícula empleando el zetasizer. La forma de las partículas parece ser esférica o casi esférica. Ya en algunos artículos se ha reportado la forma esférica de las SLN y los NLC donde se ha empleado la técnica de MEB (10), y más recientemente empleando la microscopía de transmisión electrónica (21, 31). Teeranachaideekul y colaboradores mencionan en su artículo que cuando se observa que las SLN y los NLC no presentan una forma esférica, esto se debe a modificaciones que estas sufren durante la preparación de la muestra (10).

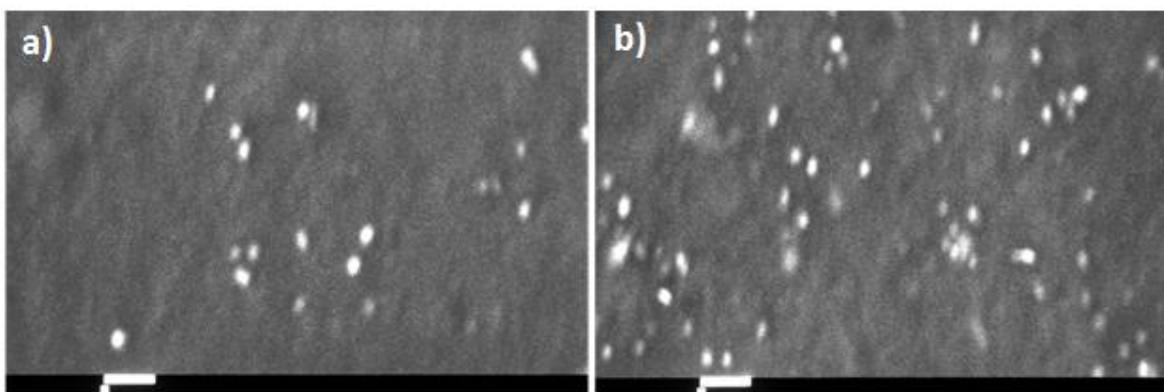


Figura 15. Fotografías de MEB de a)SLN y b)NLC. La barra equivale a 1 μm .

3. Prueba de estabilidad

En la Figura 16 se muestran los gráficos de tamaño de partícula, IP y potencial Z de las SLN en función del tiempo. Tras realizar el análisis estadístico correspondiente se encontró que la interacción de los dos factores evaluados, tiempo y condición de almacenamiento, influyen sobre el tamaño de partícula ($p=0.0002$), de tal manera que a los 90 días y a 40°C, 75%HR, la talla se incrementa de una manera significativa. El IP se ve afectado por la condición de almacenamiento ($p=0.0001$), ya que a 5°C, 40% HR, el IP se mantiene con un valor más bajo en comparación con el IP obtenido para las otras condiciones (95% Tukey). Esto nos indica que, bajo refrigeración, el tamaño de partícula se conserva más uniforme. El potencial Z se ve afectado por la interacción de los factores tiempo y condición de almacenamiento ($p<0.05$), de tal manera que a los 90 días el valor de potencial Z de las SLN conservadas a 40°C, 75%HR es menor al que presentan las SLN almacenadas bajo las otras condiciones.

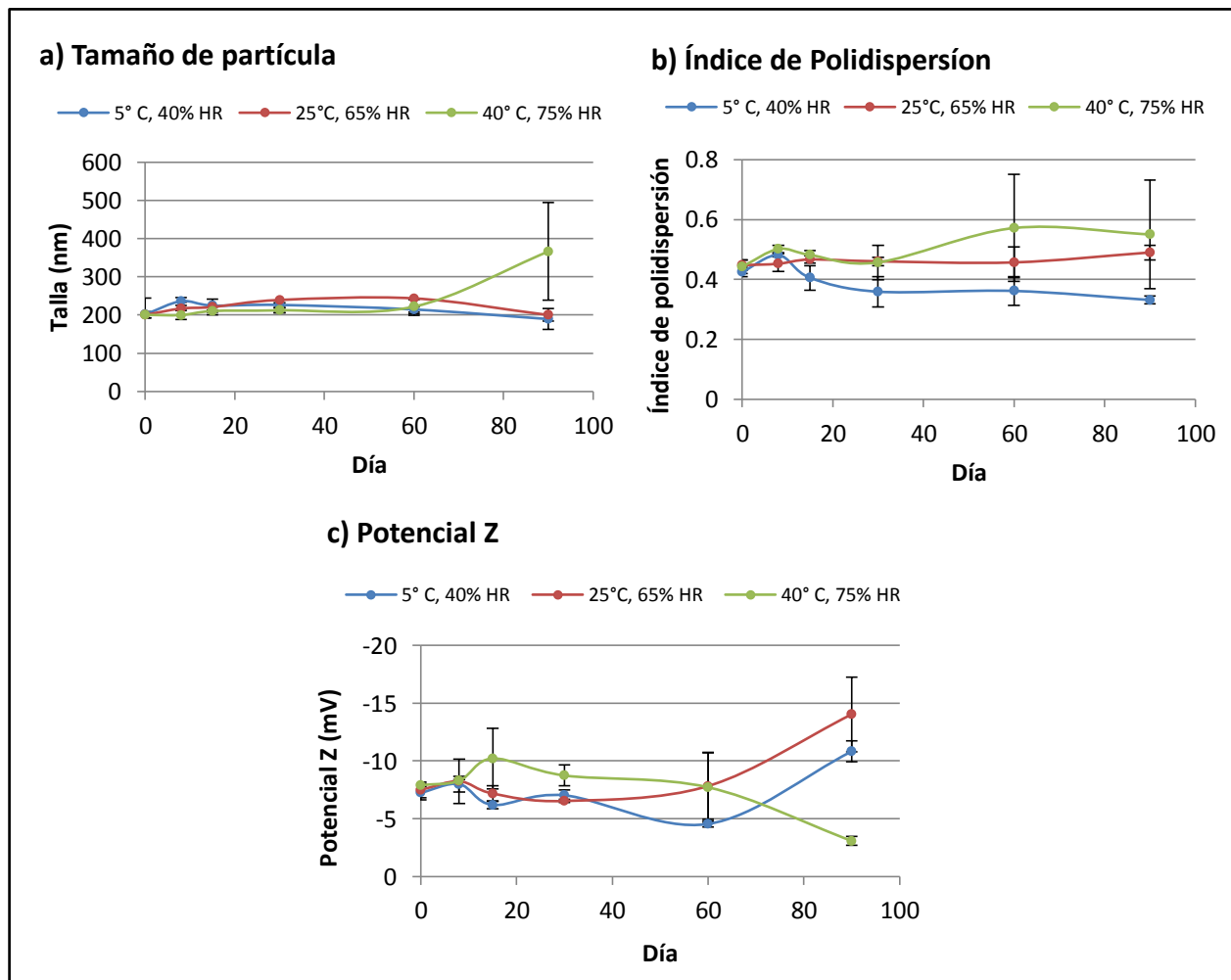


Figura 16. Estabilidad de las SLN. a) Tamaño de partícula, b) índice de polidispersión y c) potencial Z a los 0, 8, 15, 30, 60 y 90 días. Cada punto corresponde a la media (n=3) y sus respectivas barras de DE.

En la Figura 17 se muestran los gráficos de tamaño de partícula, IP y potencial Z de los NLC en función del tiempo. Tras realizar el análisis estadístico correspondiente (Anexo III), se obtiene que la talla sí incrementa para el día 90 bajo las condiciones de 25° C, 65% HR y 40°C, 75% HR (95% Tukey). Sin embargo, el IP no incrementa con el paso del tiempo lo que nos indica que el tamaño de partícula se mantiene homogéneo bajo las tres condiciones estudiadas. En cuanto al potencial Z, se observa que su valor se mantiene hasta el día 90 bajo la condición de 5°C, 40% HR, mientras que bajo las condiciones 25 °C, 65% HR y 40 °C, 75% HR se va reduciendo en función del tiempo.

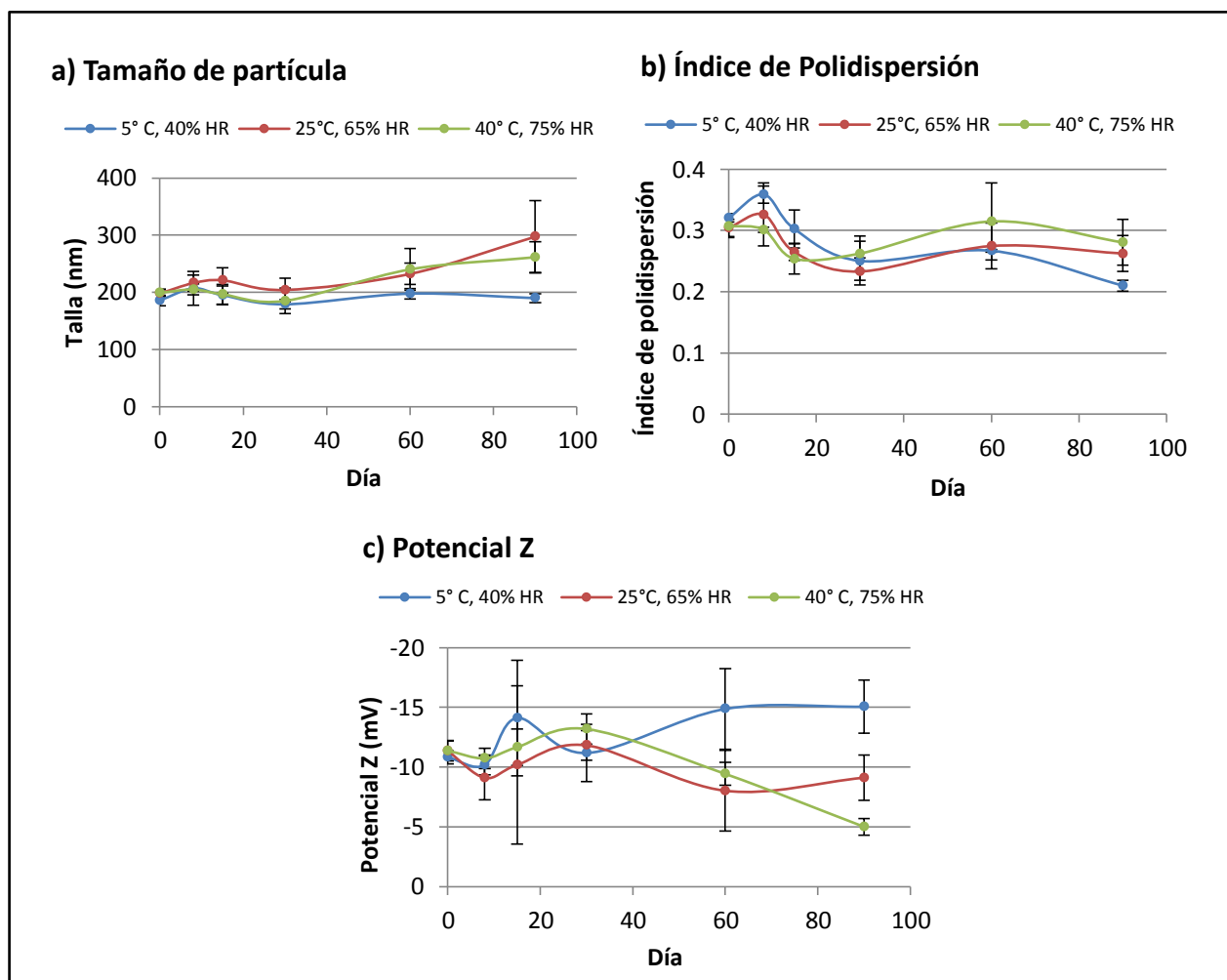


Figura 17. Estabilidad de los NLC. a) Tamaño de partícula, b) índice de polidispersión y c) potencial Z a los 0, 8, 15, 30, 60 y 90 días. Cada punto corresponde a la media (n=3) y sus respectivas barras de DE.

De manera general, las SLN y los NLC preparados mostraron ser estables durante tres meses bajo las condiciones de refrigeración (5°C, 40% HR) ya que la talla, el IP y el potencial Z se conservan sin modificaciones durante este tiempo. A pesar de que el valor de potencial Z indica que podrían existir problemas de estabilidad física durante el almacenamiento, se ha reportado que al usar poloxámero 188 para estabilizar SLN preparadas a partir de varios lípidos (Dynasan® 112, Witepsol® H5 y Compritol® 888 ATO), se logra una buena estabilidad debido al efecto estérico de este emulsificante, lo que evita la coalescencia a pesar de los valores bajos de potencial Z (43).

4. Prueba de oclusión *in vitro*

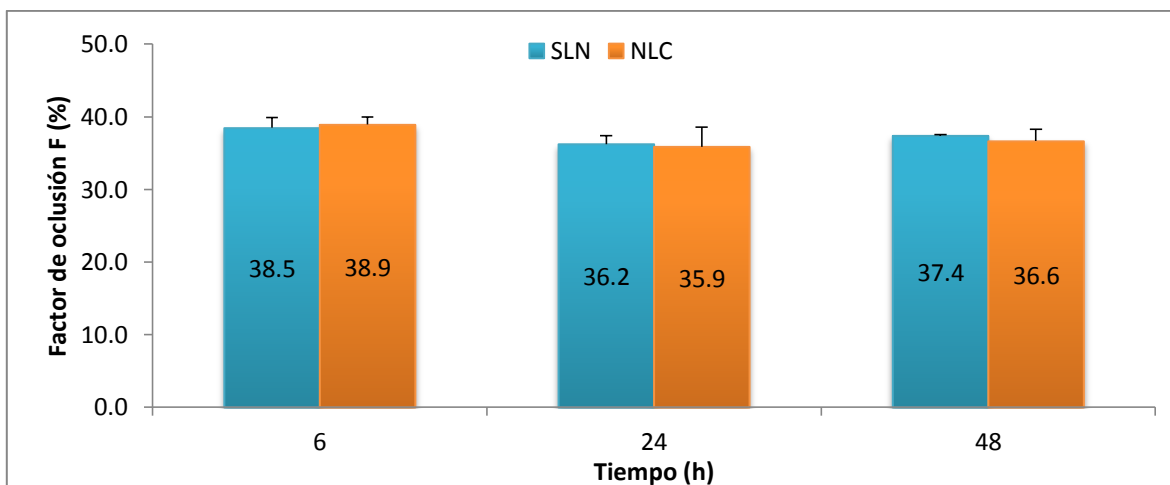


Figura 18. Efecto oclusivo de las SLN y los NLC. Se observa el valor de F en función del tiempo. Cada barra representa la media (n=3) con su respectiva barra de DE.

En la Figura 18 se observa que el factor de oclusión (F) presenta valores entre 35.9 y 38.9 para ambos sistemas desde las 6 h y hasta las 48 h que dura la prueba. No existe diferencia estadísticamente significativa para el F entre las SLN y los NLC ($p=0.7708$). Por otro lado, estadísticamente, el tiempo si tiene efecto sobre F ($p=0.0374$), existiendo una diferencia significativa del F entre el tiempo 6 y 24 h (95% Tukey). Se sabe que una de las principales características de las nanopartículas lipídicas es su capacidad de formar una película al ser aplicadas sobre la piel, por lo que se espera que este mismo fenómeno ocurra sobre el papel filtro y explique el efecto de oclusión observado. Las fotografías de MEB (Figura 19) muestran claramente la formación de la película al observarse que las fibras que componen el papel filtro quedan cubiertas por una capa de nanopartículas. Esta película explica el efecto oclusivo observado en la prueba anterior ya que actúa como una barrera física que impide de manera parcial el paso del vapor de agua a través de las fibras de papel, por lo que los sistemas tratados con nanopartículas lipídicas pierden menor cantidad de agua en relación al control. No se observaron diferencias entre la película formada por las SLN y la de los NLC, lo cual nos indica que el aceite incluido en los NLC no afecta las propiedades de formación de película de las nanopartículas lipídicas hechas a base de dibehenato de glicerilo. Por lo tanto, es de esperarse que ambos sistemas, al formar una película con las mismas características, muestren un efecto oclusivo de la misma intensidad. También se lograron identificar zonas en las que se observan agujeros de aproximadamente 10 - 80 μm en la película. Estas imperfecciones en la película pueden explicar la reducción en el factor de oclusión de las 6 a las 24 h, ya que evidentemente, estos sitios constituyen zonas por las cuales se puede estar perdiendo el agua. Se piensa que estos pequeños orificios se producen durante las primeras horas tras haber aplicado las formulaciones.

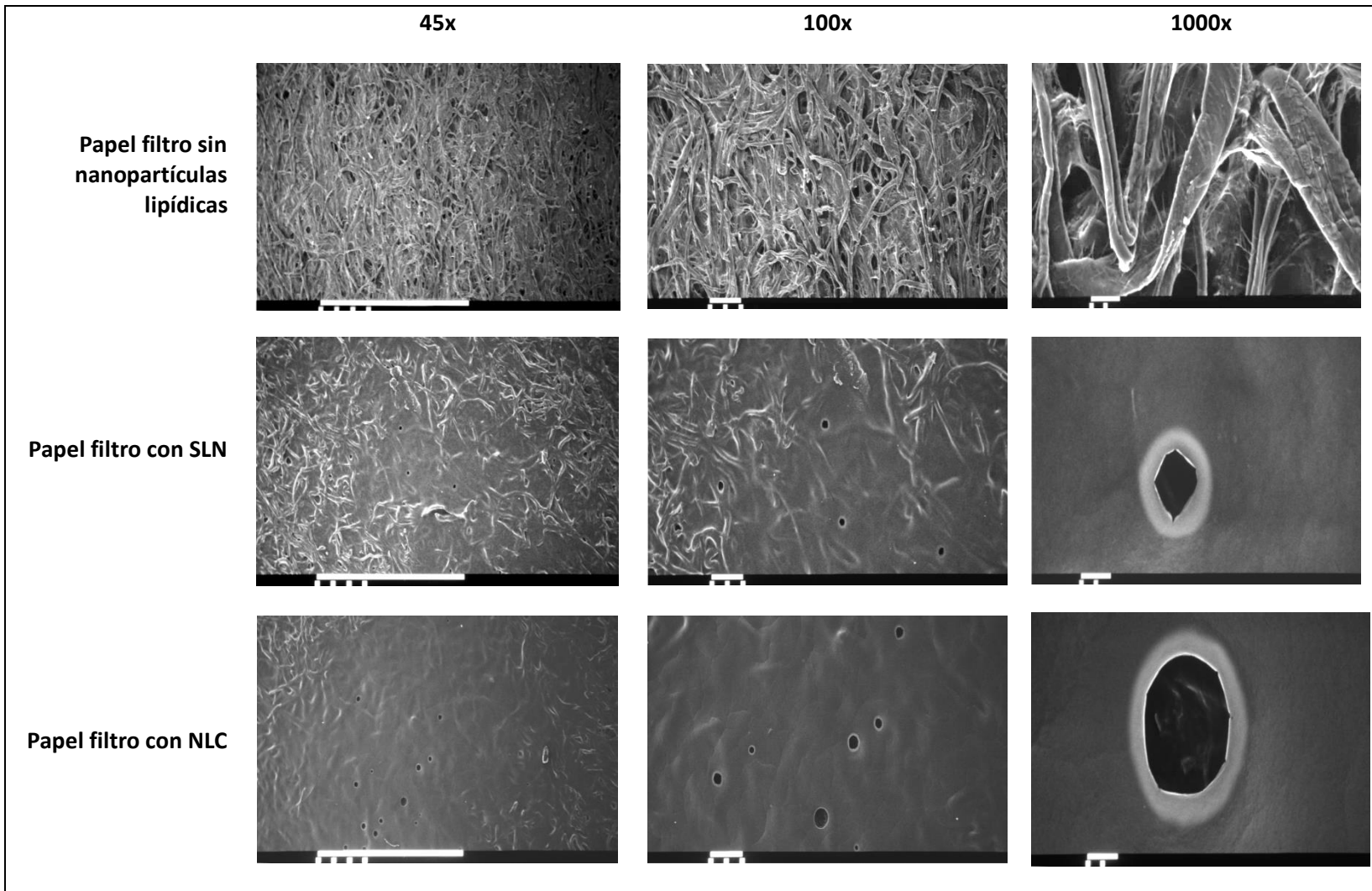


Figura 19. Fotografías de MEB del papel filtro solo y con muestra de SLN o NLC. Para 45x, la barra equivale a 1000 μm . Para 100x, la barra equivale a 100 μm . Para 1000x, la barra corresponde a 10 μm .

5. Pérdida de agua transepidermal en piel de cerdo

Estudios previos (3, 23, 25, 31, 46) han mostrado que la piel de cerdo es un modelo animal que proporciona información fiable la cual nos permite predecir la capacidad de los fármacos para penetrar y/o permear a través de la piel. De hecho, el EC de los cerdos es muy similar al de los humanos en términos de composición, la diferencia radica en cuanto al grosor. Se sabe que el grosor del EC de un cerdo joven, considerablemente más delgado que el de un cerdo adulto, es más similar a la piel humana (14).

En la Tabla 8 se comparan los valores basales de pérdida de agua transepidermal (TEWL) y humedad para la piel de cerdo intacta y sin EC. Se observa que tanto el valor de TEWL como la humedad aumentan en la piel a la cual se le ha retirado el EC. Debido a que las funciones de barrera de la piel residen principalmente sobre el EC, su remoción total o parcial por medio del tape stripping altera la barrera de la piel (3). En consecuencia, en la piel sin EC el agua puede salir más fácilmente, lo cual explica el valor de humedad registrado en la superficie de la piel.

Tabla 8. Valores basales de TEWL y humedad en piel de cerdo intacta y sin EC.

	Piel intacta (n=14)	Piel sin EC (n=12)
TEWL (g/m ² h)	6.2 ± 3.0	18.5 ± 4.2
Humedad (%)	61 ± 3	95 ± 4

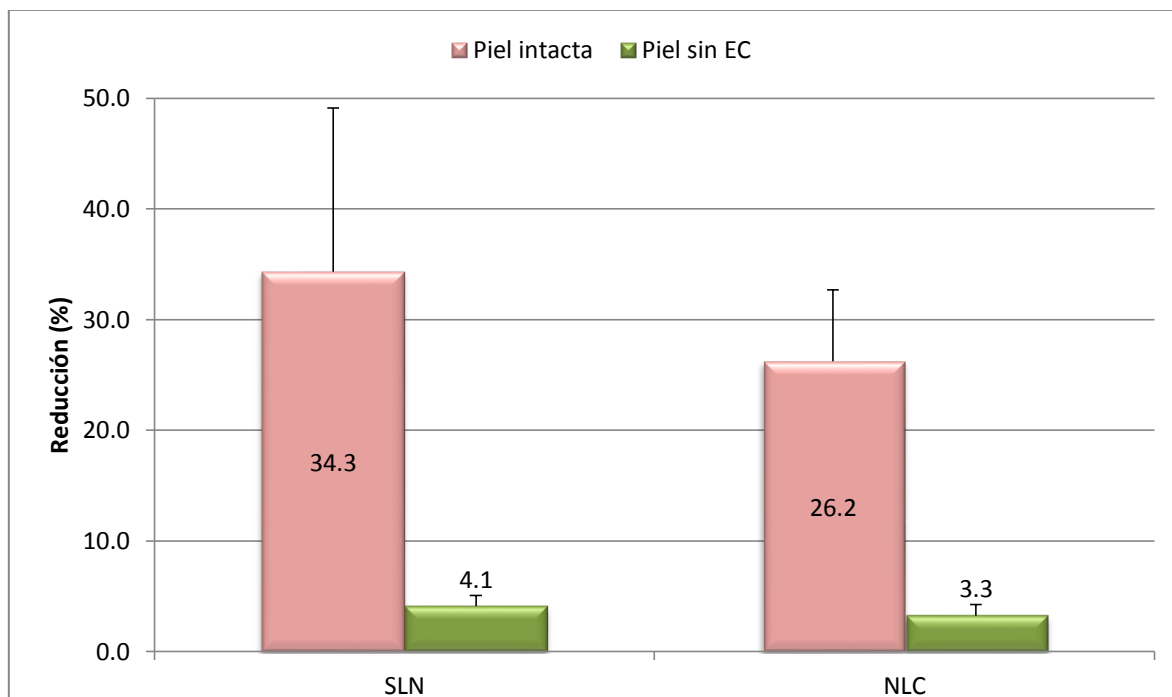


Figura 20. Gráfico de la reducción en porcentaje del valor de TEWL de piel de cerdo tras su tratamiento con SLN y NLC. Cada barra representa la media (n=6 para todas las barras menos para la de SLN en piel intacta donde n=8) con su respectiva barra de DE.

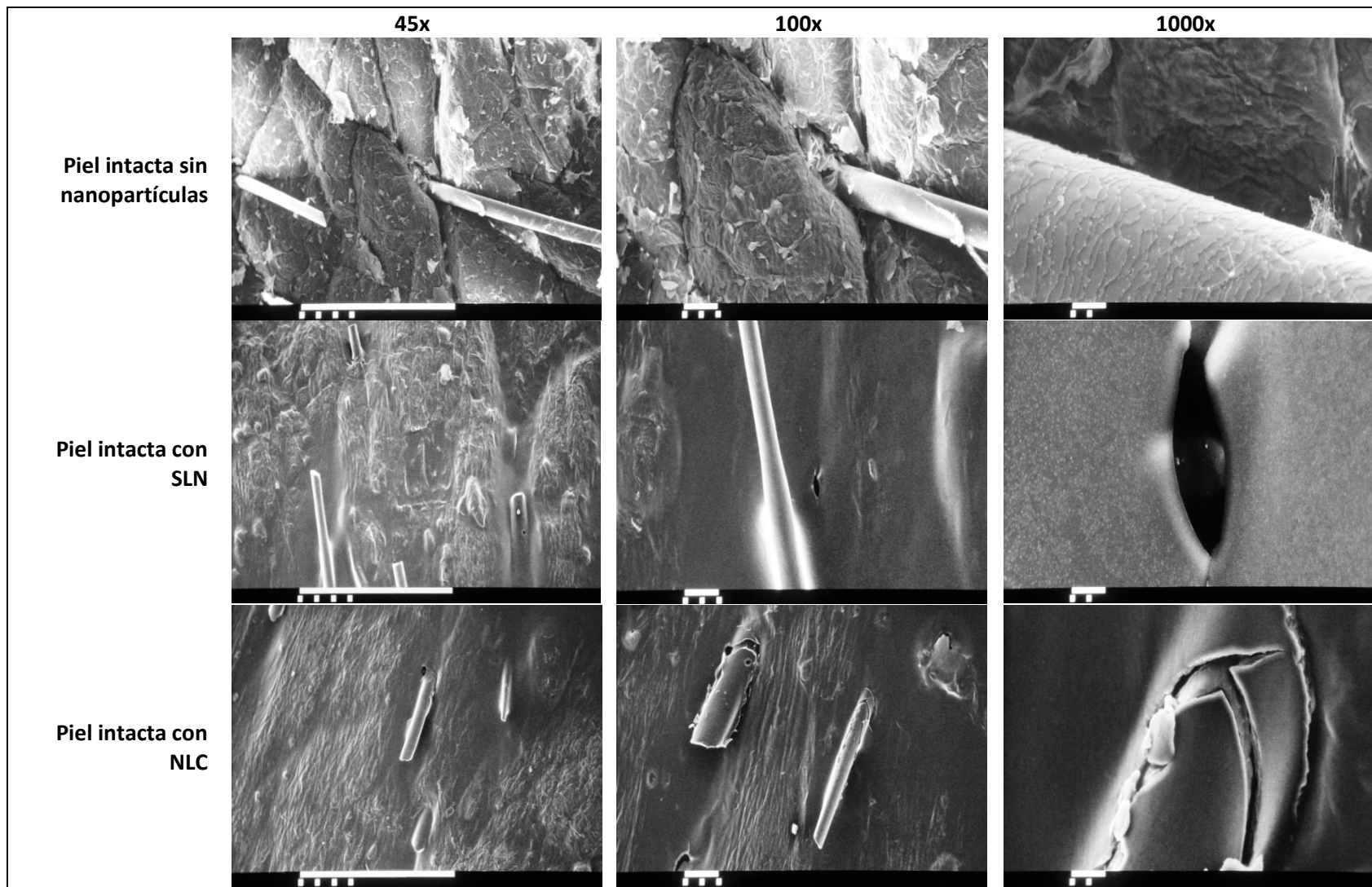


Figura 21. Fotografías de MEB de piel de cerdo intacta con SLN y NLC. Para 45x, la barra equivale a 1000 μm . Para 100x, la barra equivale a 100 μm . Para 1000x, la barra corresponde a 10 μm .

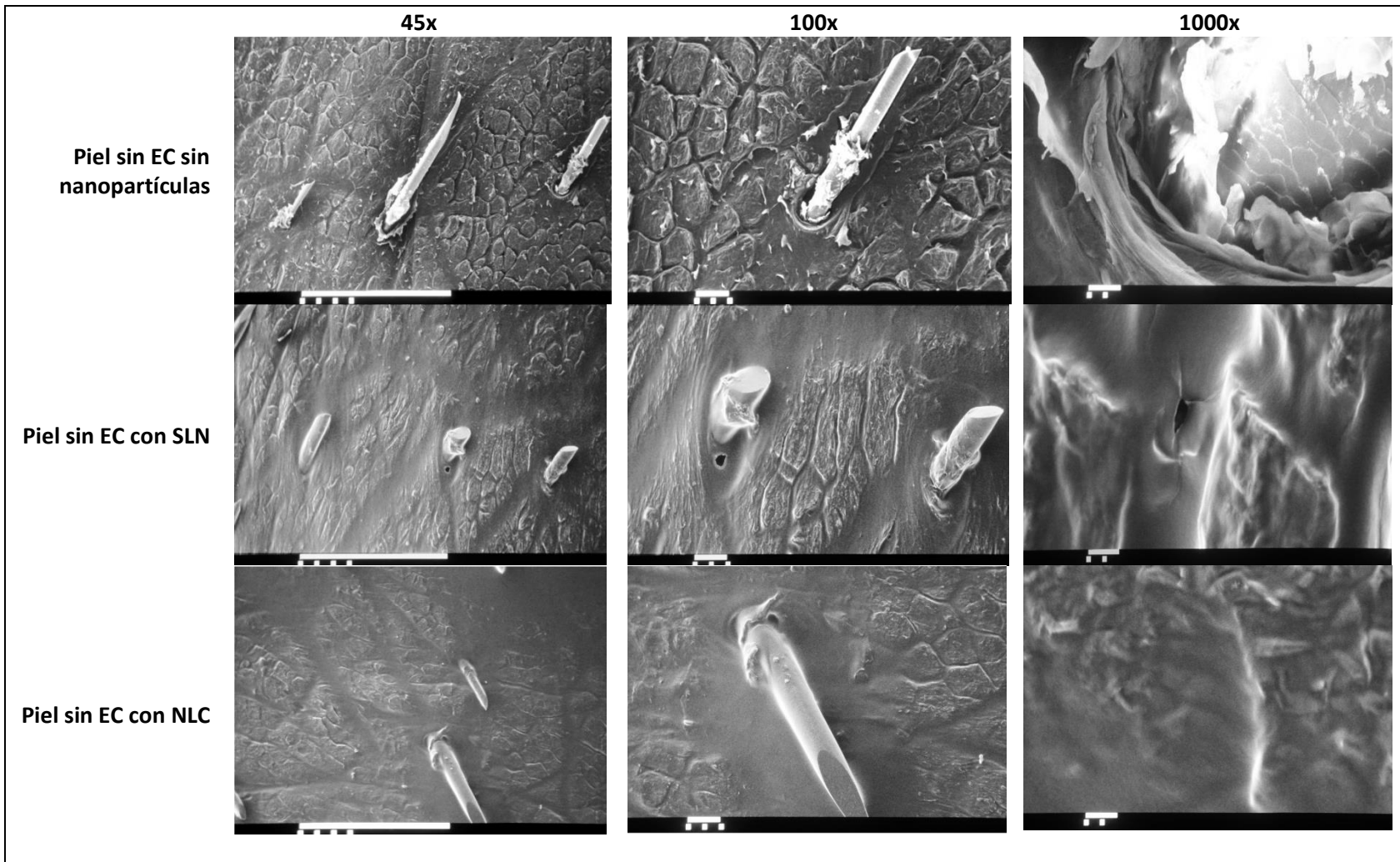


Figura 22. Fotografías de MEB de piel de cerdo sin EC con SLN y NLC. Para 45x, la barra equivale a 1000 μm . Para 100x, la barra equivale a 100 μm . Para 1000x, la barra corresponde a 10 μm .

Para ver el efecto de las SLN y los NLC sobre la TEWL, se determinó en qué grado estos sistemas reducen el valor de TEWL en porcentaje. En la Figura 20 se puede observar como se ve reducido el valor basal de TEWL de la piel intacta tras ser tratada con SLN o NLC, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre el efecto logrado por ambos sistemas ($p=0.4014$). Dicha reducción del TEWL se debe al efecto oclusivo que producen estas nanopartículas lipídicas por su capacidad de formar una película, lo cual se comprueba con las fotografías de MEB tomadas sobre la piel (Figura 21). En las fotografías de la piel intacta sin nanopartículas lipídicas se observan de manera clara los surcos propios de la piel así como algunas vellosidades, mientras que en las fotos de la piel tratada con las nanopartículas, tanto los surcos como los orificios por donde salen las vellosidades, quedan ocultos bajo la película de nanopartículas lipídicas. En las fotos a un aumento de 1000x se observa de manera más clara la presencia de la película, ya que en las zonas fotografiadas ocurrió una ruptura de la misma, posiblemente debida a la manipulación de la muestra. Por otro lado, en la piel sin EC, las nanopartículas lipídicas no producen efecto oclusivo comparable con el logrado en la piel intacta. Se piensa que esto se debe a que, al mantenerse una humedad tan alta sobre la superficie de la piel, se impide la formación de la película de nanopartículas. La Figura 22 muestra fotografías de MEB sobre piel sin EC, en donde sí se observa la formación de la película, lo cual ocurre porque al haber sido deshidratada la piel y al prepararse las muestras bajo condiciones diferentes a las del estudio de TEWL, no existe un factor humedad que afecte la formación de la película sobre la piel.

6. Estudio de penetración en piel de cerdo

La prueba de tape stripping es considerada una herramienta no invasiva que nos ayuda a explorar la ruta transepidermal de sustancias aplicadas en la superficie de la piel y que, al acoplarse con otras técnicas, proporciona información sobre el paso de las partículas a través del EC (47).

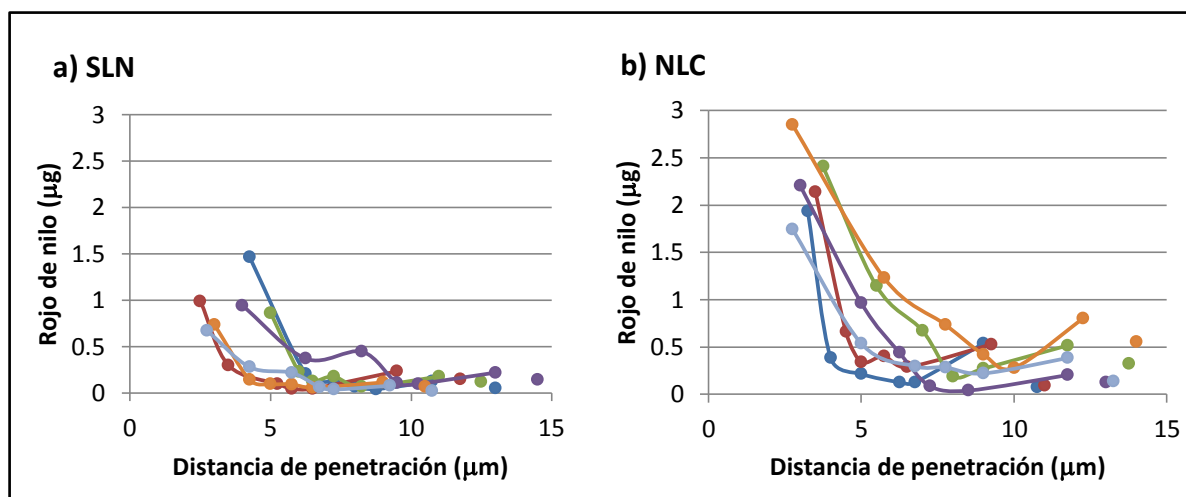


Figura 23. Gráfico de cantidad de rojo de nilo según la distancia de penetración.

Tabla 9. Distancia de penetración y cantidad total de rojo de nilo en el EC para las SLN y los NLC. Los resultados se expresan como la media \pm DE (n=6)

	SLN	NLC
Distancia de penetración (μm)	12.2 \pm 1.5	12.6 \pm 1.4
Rojo de nilo (μg)	1.7 \pm 0.4	4.7 \pm 1.3

En esta prueba se aplica la técnica de tape stripping acoplada a una cuantificación de marcador por un método espectrofotométrico, y se correlaciona la cantidad de rojo de nilo determinada con la cantidad de nanopartículas que penetran en la piel. Como se observa en la Figura 23, la cantidad de rojo de nilo que penetra es mayor para los NLC. Hay que tener en consideración que para ambos sistemas, la primera cinta fue la que aportó la mayor cantidad de rojo de nilo, lo que se ve reflejado en la forma de las curvas. Algunos autores mencionan que la primera cinta incluye los materiales no penetrados (47). No existe diferencia estadísticamente significativa entre la distancia máxima a la que se llegó con el tape stripping para las SLN y para los NLC ($p=0.4696$), sin embargo, si existe diferencia entre los sistemas en cuanto a la cantidad total de rojo de nilo que penetró hasta esta distancia ($p=0.0050$), siendo 2.7 veces mayor para los NLC, en comparación con las SLN (Tabla 9). Esto indica que la composición de las nanopartículas lipídicas tiene una influencia sobre su capacidad para promover la penetración de sustancias a través del EC debido a la manera en que los lípidos de las nanopartículas interactúan con los componentes de la piel. A partir de diferentes estudios se sabe que son varios los factores que influyen en la penetración de las nanopartículas en la piel. Entre estos se encuentran las características fisicoquímicas de las nanopartículas (tamaño, carga superficial, composición química, estado físico de la formulación puesta en contacto con la piel), los factores atribuidos a la formulación (estado físico, vehículo), y factores experimentales (concentración, dosis y tiempo de exposición de las nanopartículas) (3).

En otros estudios se ha reportado la capacidad de los NLC de llegar a capas más profundas del EC. Por ejemplo, en un estudio se comparó la penetración del ácido flufenámico (fármaco modelo) incluido en SLN y NLC empleando la técnica de tape stripping (20 cintas) en piel de cerdo. Los investigadores encontraron que los NLC penetraron a capas más profundas de la piel, alrededor del 63% del EC, sin embargo, la diferencia con las SLN no fue estadísticamente significativa (46). Jensen y colaboradores (48), atribuyen la capacidad de penetración de las nanopartículas lipídicas al factor de solubilidad (SP por sus siglas en inglés) de los lípidos. El SP influye sobre la penetración de las nanopartículas lipídicas ya que es un indicador de la interacción de estas con los lípidos de la piel, de esta manera, los compuestos que presentan un SP cercano al de la piel tendrán una mayor miscibilidad con esta. El SP de la piel de cerdo se estima en 10 (48), por lo tanto los lípidos con un valor cercano a este se espera que sean más miscibles con los lípidos que la conforman y por lo tanto que la penetración sea mayor. Se calculó entonces el SP del Compritol® 888 ATO y de los triglicéridos cáprico/caprílico según el método de sustituyentes de Fedors (49). Los valores calculados son 9.34 para el Compritol® 888 ATO y 10.36 para los triglicéridos cáprico/caprílico, por lo tanto, en base a estos valores, se puede afirmar que estos últimos tienen una afinidad mayor con los lípidos de la piel lo que explica su mayor capacidad de penetración en el EC.

CONCLUSIONES

- Se definieron las siguientes condiciones para la preparación de las SLN y los NLC por el método de homogenización a alto cizallamiento: 20,000 rpm por 5 min a 90 °C, empleando como estabilizante el Lutrol® F-68 (poloxámero 188), y la proporción de 90:10 de dibehenato de glicerilo y triglicéridos cáprico/caprílico respectivamente para los NLC.
- Se lograron preparar SLN de dibehenato de glicerilo de tamaño con partícula de 200 ± 6 nm y potencial Z de -7.5 ± 0.6 mV, así como NLC de dibehenato de glicerilo y triglicéridos cáprico/caprílico (90:10) con tamaño de partícula de 192 ± 11 nm y potencial Z de -11.1 ± 0.8 mV. Ambos sistemas constan de partículas de forma esférica.
- Las SLN y los NLC mostraron tener estabilidad en suspensión hasta por 3 meses en condiciones de refrigeración (5°C y 40% HR) ya que no se presentaron cambios significativos ($\alpha=0.05$) en cuanto al tamaño de partícula, IP y potencial Z. Dicha estabilidad se logró con el poloxámero 188, el cual impide que las partículas se agreguen al producir un efecto estérico.
- Ambos sistemas mostraron un efecto oclusivo favorable tanto en la prueba de oclusión *in vitro* como en la de TEWL, obteniéndose resultados comparables y sin diferencias entre ambos sistemas. Se comprobó que este efecto se debe a la capacidad de estas nanopartículas lipídicas de formar una película, la cual se visualizó mediante la MEB. La diferencia en la composición de ambos sistemas no influye en su capacidad de formación de la película, la cual se observa físicamente similar.
- Los NLC lograron una penetración a través del EC 2.7 veces mayor en comparación a las SLN, lo cual sugiere que la inclusión del aceite en la composición de estos sistemas produce una mejor interacción de estos acarreadores con los componentes del EC (de acuerdo a los valores del parámetro de solubilidad), lo que conduce a un incremento en su capacidad de penetración.

PERSPECTIVAS

Estos sistemas tienen amplia aplicación tanto en el área farmacéutica como cosmética, por lo que la continuación de este trabajo puede enfocarse en:

Evaluar SLN y NLC preparados a base de diferentes lípidos para determinar si su efecto oclusivo y su capacidad de penetración se modifican en función del lípido empleado.

Realizar estudios de permeación con estos sistemas incluyendo activos cosméticos y/o farmacéuticos, con el fin de determinar si el tipo de sistema (SLN o NLC) influye en la capacidad de permeación de los activos.

En el ámbito cosmético, evaluar y comparar el efecto de los dos tipos de sistemas sobre el grado de hidratación de la piel y sobre la topografía superficial de la misma, determinando si mejoran la apariencia de la piel a disminuir líneas de expresión o arrugas.

Incluir estas nanopartículas en productos cosméticos (e.g., emulsiones, geles) y realizar pruebas para determinar si mejoran las propiedades cosméticas del producto en relación al mismo sin nanopartículas.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Mehnert, Wolfgang y Mäder, Karsten.** *Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications.* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 2001, pp. 165–196.
2. **Neubert, Reinhard.** *Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery.* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77, 2011, pp. 1-2.
3. **Labouta, Hagar y Schneider, Marc.** *Interaction of inorganic nanoparticles with the skin barrier: current status and critical review.* *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9, 2013, pp. 39-54.
4. **Müller, R; Radteke, M y Wissing, S.** *Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations.* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 2002, pp. S131-S155.
5. **Gao, Yu; et al.** *Nanotechnology-based intelligent drug design for cancer metastasis treatment.* *Biotechnology Advances*, 2013.
6. **Safari, Javad y Zarnegar, Zohre** *Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review.* *Journal of Saudi Chemical Society*, 2013.
7. **Beck, Ruy; Guterres, Silvia y Pohlman, Adriana.** *Nanocosmetics and Nanomedicines, New approaches for skin care.* Berlin : Springer, 2011. pp. 3-21.
8. **Teeranachaideekul, Veerawat, Müller, Rainer y Junyaprasert, Varaporn.** *Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC)—Effects of formulation parameters on physicochemical stability.* *International Journal of Pharmaceutics*, 340, 2007, pp. 198-206.
9. **Jores, Katja; et al.** *Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy.* *Journal of Controlled Release*, 95, 2004, pp. 217-227.
10. **Teeranachaideekul, Veerawat; et al.** *Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10— Development, physicochemical characterization and in vitro release studies.* *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 2007, pp. 141-148.
11. **Müller, R; et al.** *Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products.* *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 2007, pp. 522-530.
12. **Lippacher, A; Müller, R y Mäder, K.** *Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles.* *International Journal of Pharmaceutics*, 214, 2001, pp. 9-12.

13. **Schubert, M y Müller-Goymann, C.** *Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 55, 2003, pp. 125-131.
14. **Montenegro, Lucia; et al.** *Idebenone-loaded solid lipid nanoparticles for drug delivery to the skin: In vitro evaluation.* International Journal of Pharmaceutics, 434, 2012, pp. 169-174.
15. **Noriega, Eddy; et al.** *Optimization of the emulsification and solvent displacement method for the preparation of solid lipid nanoparticles.* Drug Development and Industrial Pharmacy, 37, 2011, pp. 160-166.
16. **Tortora, Gerard y Derrickson, Bryan.** *Principios de Anatomía y Fisiología.* México, D.F.: Editorial Médica Panamericana, 2006. pp. 147-151.
17. **University of Washington.** UW Courses Web Server, Skin structure and function. [Online] 2013. http://courses.washington.edu/bioen327/Labs/Lit_SkinStruct_Bensouillah_Ch01.pdf.
18. **Prow, Tarl; et al.** *Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery.* Advanced Drug Delivery Reviews, 63, 2011, pp. 470-491.
19. **Beiersdorf.** Eucerin, Programa médico para el cuidado de la piel. [Online] 2005. http://www2.eucerin.es/skin/physio_4.html.
20. **Wissing, Sylvia y Müller, Rainer.** *The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity – in vivo study.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 56, 2003, pp. 67-72.
21. **Vaghasiya, Harshad; Kumar, Abhinesh y Sawant, Krutika.** *Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 49, 2013, pp. 311-322.
22. **Wissing, Sylvia y Müller, Rainer.** *Cosmetic applications for solid lipid nanoparticles (SLN).* International Journal of Pharmaceutics, 254, 2003, pp. 65-68.
23. **Liu, Jie; et al.** *Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery.* International Journal of Pharmaceutics, 328, 2007, pp. 191-195.
24. **Pardeike, Jana; Schwabe, Kay y Müller, Rainer.** *Influence of nanostructured lipid carriers (NLC) on the physical properties of the Cutanova Nanorepair Q10 cream and the in vivo skin hydration effect.* International Journal of Pharmaceutics, 396, 2010, pp. 166-173.
25. **Mitri, Khalil; et al.** *Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance.* International Journal of Pharmaceutics, 414, 2011, pp. 267-275.

26. **Hung, Loo; et al.** *An improved method for the preparations of nanostructured lipid carriers containing heat-sensitive bioactives.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 87, 2011, pp. 180-186.
27. **Padois, Karine; et al.** *Solid lipid nanoparticles suspension versus commercial solutions for dermal delivery of minoxidil.* International Journal of Pharmaceutics, 416, 2011, pp. 300-304.
28. **Ridolfi, Daniela; et al.** *Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin.* Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 93, 2012, pp. 36-40.
29. **Han, Fei; et al.** *Nanostructured lipid carriers (NLC) based topical gel of flurbiprofen: Desing, charcaterization and in vivo evaluation.* International Journal of Pharmaceutics, 439, 2012, pp. 349-357.
30. **Khurana, S, Jain, N y Bedi, P.** *Development and characterization of a novel controlled release drug delivery system based on nanostructured lipid carriers gel for meloxicam.* Life Sciences, 93, 2013, pp. 763-772.
31. **Bose, Solani y Michniak-Kohn, Bozena.** *Preparation and characterization of lipid based nanosystems for topical delivery of quercetin.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 48, 2013, pp. 442-452.
32. **Puglia, Carmelo; et al.** *Evaluation of nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions as carriers for UV-filters: Characterization, in vitro penetration and photostability studies.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 51, 2014, pp. 211-217.
33. **Janchuk, Omel y Svetlana, Vilinskaja.** *Moisturising cream with solid lipid nanoparticles.* RU2491911 Rusia, Septiembre 10, 2013.
34. **Dahms, Gerd; Jung, Andreas y Seidel, Holger.** *Compositions for the targetted release of fragrances and aromas.* US 2007/0105746 A1 USA, Mayo 10, 2007.
35. **Herzog, Bernd.** *Formulation of UV absorbers by incorporation in solid lipid naoparticles.* US 2003/0235540 A1 USA, Diciembre 25, 2003.
36. **De Szalay, Sarah.** *Skin sanitizer compositions comprising alcohol based emulsion.* US 2013/0280312 A1 USA, Octubre 24, 2013.
37. **Puri, D; et al.** *Lipid Nanoparticles (SLN, NLC): A Novel Approach for Cosmetic and Dermal Pharmaceutical.* Journal of Global Pharma Technology, 2009.
38. **Teeranachaideekul, Veerawat; et al.** *Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC.* Journal of Controlled Release, 128, 2008, pp. 134-141.
39. **Schatten, Heide.** *Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences.* New York : Cambridge University Press, 2013. pp. 2-13.
40. **IKA.** Información técnica, Manual Ultra-Turrax T18. 2008. p. 30.

41. **Kovacevic, A; et al.** *Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure.* International Journal of Pharmaceutics, 406, 2011, pp. 163-172.
42. **Das, Surajit; Kiong, Wai y Tan, Reginald.** *Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 47, 2012, pp. 139-151.
43. **Garzón, María; et al.** *Efecto de los componentes de la formulación en las propiedades de las nanopartículas lipídicas sólidas.* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 2, 2009, pp. 26-40.
44. **Rowe, Raymond; Sheskey, Paul y Owen, Siân.** *Handbook of Pharmaceutical Excipients.* 5°. London : Pharmaceutical Press, 2006. pp. 304-305, 454-456, 535-538, 592-593.
45. **Zhejiang NetSun Co.** 65381-09-1 Caprylic capric triglyceride. [Online] <http://www.chemnet.com/dict/dict--65381-09-1--jp.html>.
46. **Schwarz, Julia; et al.** *Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties.* International Journal of Pharmaceutics, 437, 2012, pp. 83-88.
47. **Iannuccelli, Valentina; et al.** *In vivo detection of lipid-based nano- and microparticles in the outermost human stratum corneum by EDX analysis.* International Journal of Pharmaceutics, 447, 2013, pp. 204-212.
48. **Jensen, L; Petersson, K y Nielsen, H.** *In vitro penetration properties of solid lipid nanoparticles in intact and barrier-impaired skin.* European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 79, 2011, pp. 68-75.
49. **James, Kennet.** *Solubility and related properties.* NY : Marcel Dekker, 1986. pp. 174-188.

ANEXOS

ANEXO I. PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE LOS LÍPIDOS Y ESTABILIZANTES

Dibehenato de Glicerilo (Compritol® 888 ATO) (44).

El Compritol® 888 ATO está basado en ésteres de glicerol del ácido behénico (C₂₂). Consiste en tribehenato de glicerilo (28-32%), dibehenato de glicerilo (52-54%) y monobehenato de glicerilo (12-18%). El principal ácido graso es el ácido behénico (>85%) sin embargo también están presentes otros ácidos grasos (C₁₆-C₂₀).

Estructura:

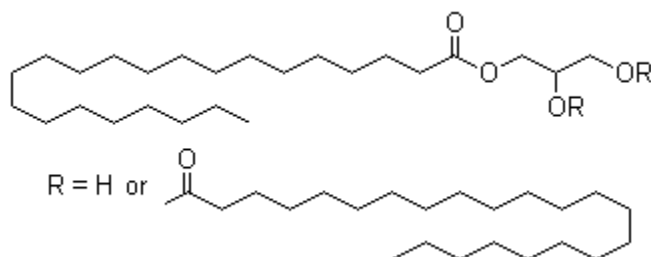


Figura 24. Fórmula estructural del monobehenato de glicerilo (las dos R=H), dibehenato de glicerilo (R=H y R=behenato) y tribehenato de glicerilo (las dos R= behenato)

Apariencia física: polvo fino blanco o masa cerosa de ligero olor.

Punto de fusión: 65 – 77 °C

Solubilidad: soluble en cloroformo y diclorometano bajo calentamiento. Prácticamente insoluble en metanol, hexano, aceite mineral y agua.

Triglicéridos cáprico/caprílico (45).

Nombre químico: triglicérido del ácido octanoico decanoico

Este lípido consiste en triacilgliceroles de cadena media (C₈ – C₁₀). Tiene la fórmula C₂₁H₄₀O₅.

Estructura:

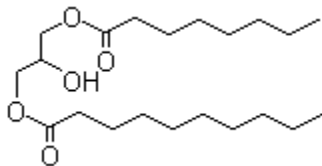


Figura 25. Fórmula estructural del triglicérido cáprico/caprílico.

Punto de fusión: 142 °C

Poloxámero 188 (Lutrol® F68) (44).

Nombre químico: α -hidro- ω -hidroxipoli(oxietileno)poli(oxipropileno)poli(oxietileno) copolímero de bloque.

El poloxámero 188 es un copolímero de bloque de óxido de etileno y óxido de propileno con la siguiente fórmula $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{80}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_{27}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_{80}\text{H}$.

Estructura:

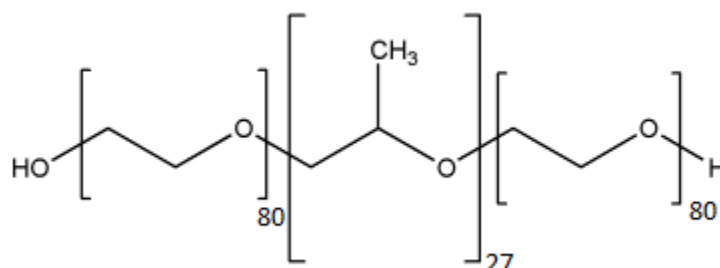


Figura 26. Fórmula estructural del poloxámero 188.

Peso molecular promedio: 7680 – 9510

Apariencia física:

HLB: 29

Solubilidad: soluble en etanol (95%) y agua

Alcohol poli vinílico (Mowiol® 4-88) (44).

Nombre químico: homopolímero de etenol

El alcohol polivinílico es un polímero sintético soluble al agua con la fórmula general $(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$. La cantidad n tiene valores entre 500 y 5000.

Estructura:

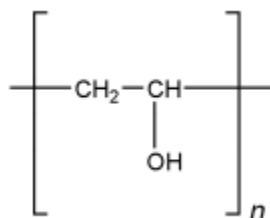


Figura 27. Fórmula estructural del alcohol poli vinílico.

Peso molecular: $\sim 31,000$

Apariencia física: cristales incoloros

Punto de fusión: 200°C

Solubilidad: soluble en agua, ligeramente soluble en etanol (95%), insoluble en disolventes orgánicos.

ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: CONDICIONES DE PREPARACIÓN

Efecto del tiempo de agitación sobre el tamaño de partícula

Reducción del tamaño de partícula en porcentaje en función del tiempo de agitación

Tabla 10. Tabla ANOVA para REDUCCIÓN DEL TAMAÑO por TIEMPO DE AGITACIÓN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	503.872	3	167.957	7.26	0.0113
Intra grupos	185.05	8	23.1312		
Total (Corr.)	688.922	11			

La Tabla 10 descompone la varianza de REDUCCIÓN DEL TAMAÑO en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de REDUCCIÓN DEL TAMAÑO entre un nivel de TIEMPO DE AGITACIÓN y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

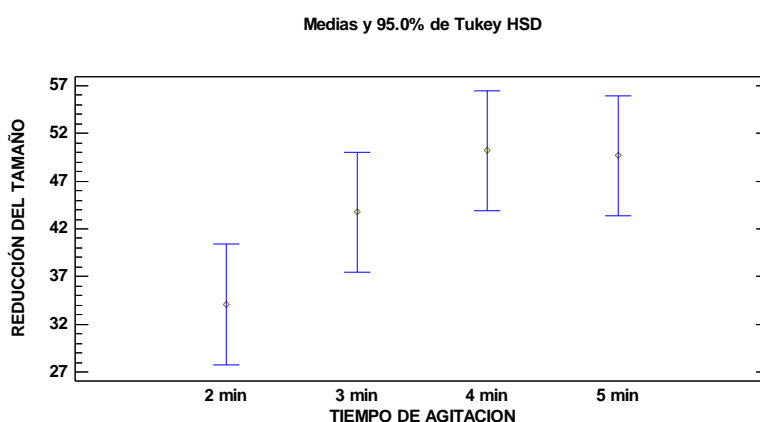


Figura 28. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor TIEMPO DE AGITACIÓN sobre la REDUCCIÓN DEL TAMAÑO (n=3).

Tabla 11. Pruebas de rangos múltiples para REDUCCIÓN DEL TAMAÑO por TIEMPO DE AGITACIÓN. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
2 min - 3 min		-9.67005	12.5709
2 min - 4 min	*	-16.1083	12.5709
2 min - 5 min	*	-15.5668	12.5709
3 min - 4 min		-6.43824	12.5709
3 min - 5 min		-5.89679	12.5709
4 min - 5 min		0.541455	12.5709

* indica una diferencia significativa.

La Tabla 11 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Comparación del tamaño de partícula: 1 min vs 5 min de agitación

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov
Valor P aproximado = 0.00855364
- Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas

Mediana de muestra 1: 394.25 (n=6)

Mediana de muestra 2: 202.9 (n=5)

Hipótesis Nula: mediana1 = mediana2

Hipótesis Alt.: mediana1 <> mediana2

Rango Promedio de muestra 1: 8.5

Rango Promedio de muestra 2: 3.0

W = 0 valor-P = 0.00811318

Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Efecto del tiempo de sonicación sobre el tamaño de partícula y el IP

Tabla 12. Tabla ANOVA para TALLA por TIEMPO DE SONICACIÓN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	11334.0	2	5666.98	84.53	0.0000
Intra grupos	804.536	12	67.0447		
Total (Corr.)	12138.5	14			

La Tabla 12 descompone la varianza de TALLA en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de TALLA entre un nivel de TIEMPO DE SONICACIÓN y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

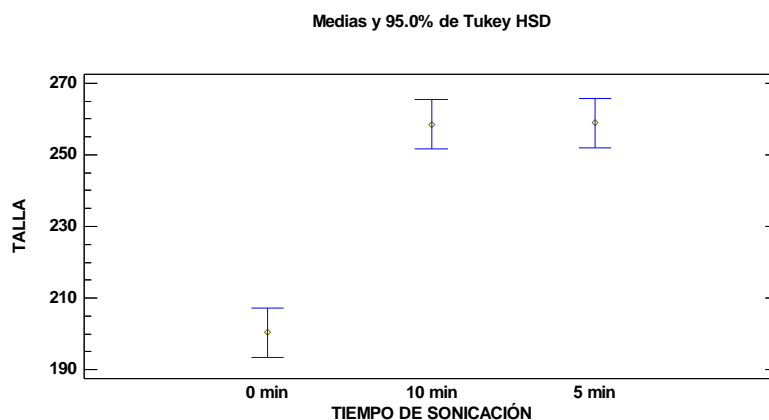


Figura 29. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor TIEMPO DE SONICACIÓN sobre la TALLA (n=5).

Tabla 13. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por TIEMPO DE SONICACIÓN. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 min - 10 min	*	-58.1	13.8538
0 min - 5 min	*	-58.52	13.8538
10 min - 5 min		-0.42	13.8538

* indica una diferencia significativa.

La Tabla 13 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias

estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Tabla 14. Tabla ANOVA para IP por TIEMPO DE SONICACIÓN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0.04332	2	0.02166	101.44	0.0000
Intra grupos	0.0025624	12	0.000213533		
Total (Corr.)	0.0458824	14			

La Tabla 14 descompone la varianza de IP en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de IP entre un nivel de TIEMPO DE SONICACIÓN y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

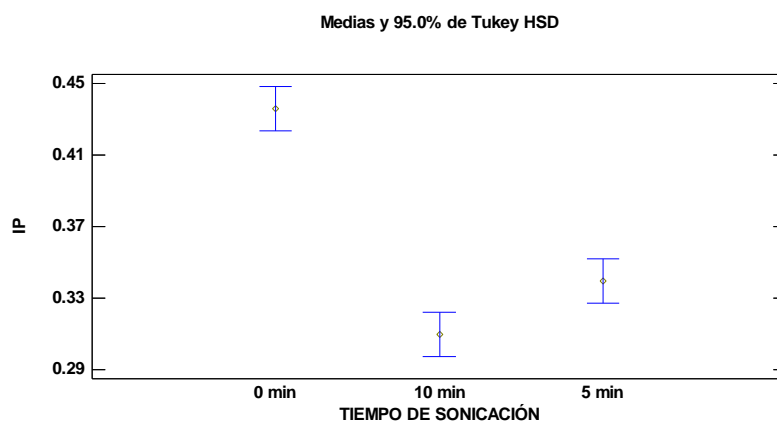


Figura 30. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor TIEMPO DE SONICACIÓN sobre el IP (n=5).

Tabla 15. Pruebas de rangos múltiples para IP por TIEMPO DE SONICACIÓN. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 min - 10 min	*	0.126	0.024724
0 min - 5 min	*	0.096	0.024724
10 min - 5 min	*	-0.03	0.024724

* indica una diferencia significativa.

La Tabla 15 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 3 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Efecto de la proporción de lípido sólido/ lípido líquido sobre el tamaño de partícula

Tabla 16. Tabla ANOVA para TALLA por PROPORCIÓN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	870.402	2	435.201	8.29	0.0187
Intra grupos	314.86	6	52.4767		
Total (Corr.)	1185.26	8			

La Tabla 16 descompone la varianza de TALLA en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de TALLA entre un nivel de PROPORCIÓN y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

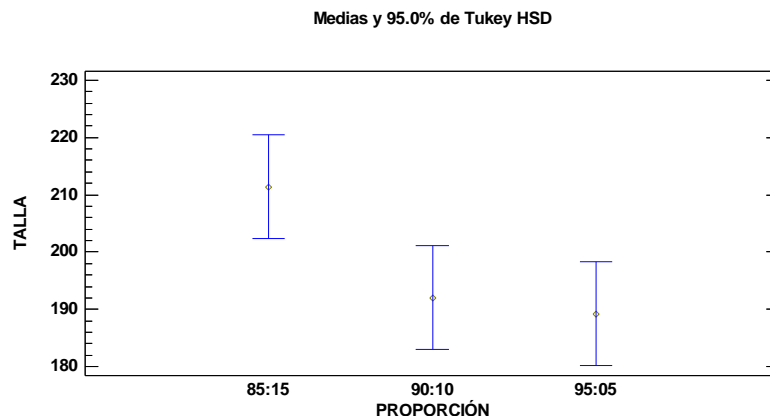


Figura 31. Gráfico de medias de Tukey del efecto del factor PROPORCIÓN sobre la TALLA (n=3).

Tabla 17. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por PROPORCIÓN. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
85:15 - 90:10	*	19.3	18.1483
85:15 - 95:05	*	22.1333	18.1483
90:10 - 95:05		2.83333	18.1483

* indica una diferencia significativa.

La Tabla 17 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

ANEXO III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: ESTABILIDAD

ESTABILIDAD DE LAS SLN

- TALLA**

Tabla 18. Análisis de Varianza para TALLA de las SLN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DIA	12537.8	5	2507.57	2.08	0.0911
B:CONDICIÓN	3817.0	2	1908.5	1.58	0.2198
INTERACCIONES					
AB	59862.7	10	5986.27	4.96	0.0002
RESIDUOS	43469.6	36	1207.49		
TOTAL (CORREGIDO)	119687.	53			

La Tabla 18 descompone la variabilidad de TALLA SLN en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que el valor-P de la interacción es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre TALLA SLN con un 95.0% de nivel de confianza.

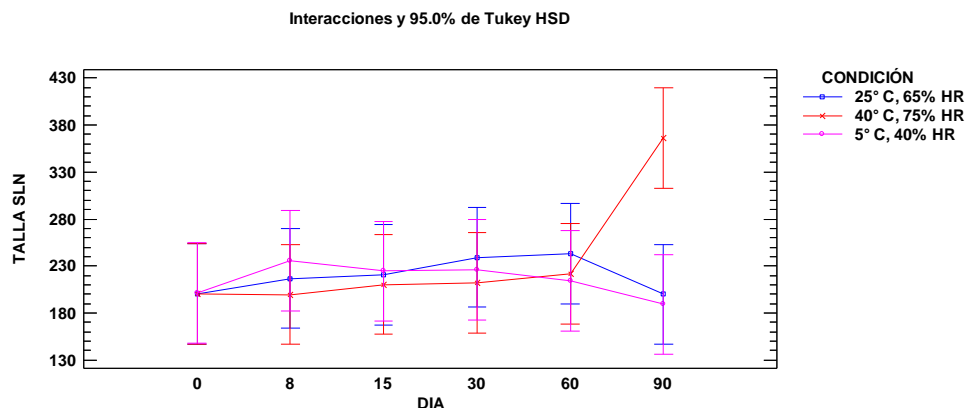


Figura 32. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre la TALLA (95% de Tukey, n=3).

- IP**

Tabla 19. Análisis de Varianza para IP de las SLN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DIA	0.0156165	5	0.0031233	0.70	0.6293
B:CONDICIÓN	0.105806	2	0.0529028	11.80	0.0001
INTERACCIONES					
AB	0.0717984	10	0.00717984	1.60	0.1457
RESIDUOS	0.161357	36	0.00448213		
TOTAL (CORREGIDO)	0.354577	53			

La Tabla 19 descompone la variabilidad de IP en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que el valor-P para el factor CONDICION es menor que 0.05, este tiene un efecto estadísticamente significativo sobre IP con un 95.0% de nivel de confianza.

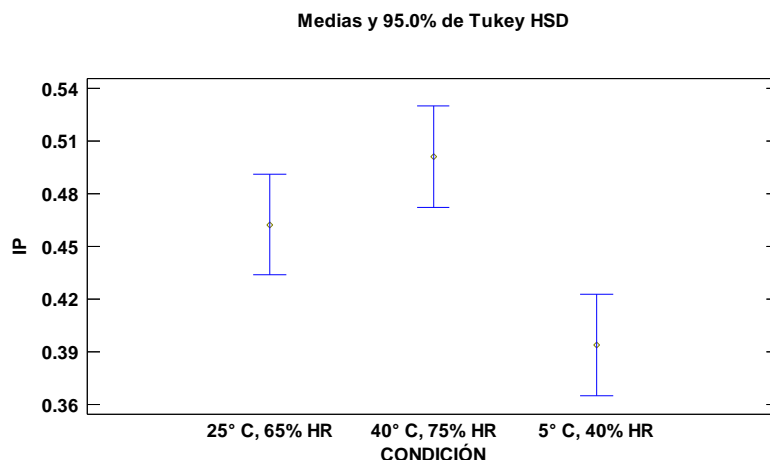


Figura 33. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor CONDICION sobre el IP (n=3).

Tabla 20. Pruebas de rangos múltiples para IP por CONDICION de las SLN. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
25° C, 65% HR - 40° C, 75% HR		-0.038537	0.0574802
25° C, 65% HR - 5° C, 40% HR	*	0.0685	0.0574802
40° C, 75% HR - 5° C, 40% HR	*	0.107037	0.0574802

La Tabla 20 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

• **POTENCIAL Z**

Tabla 21. Análisis de Varianza para POTENCIAL Z de los SLN.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DIA	34.5569	5	6.91138	2.92	0.0258
B:CONDICIÓN	14.9243	2	7.46215	3.15	0.0547
INTERACCIONES					
AB	231.493	10	23.1493	9.79	0.0000
RESIDUOS	85.165	36	2.36569		
TOTAL (CORREGIDO)	366.139	53			

La Tabla 21 descompone la variabilidad de POTENCIAL Z en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre POTENCIAL Z con un 95.0% de nivel de confianza.

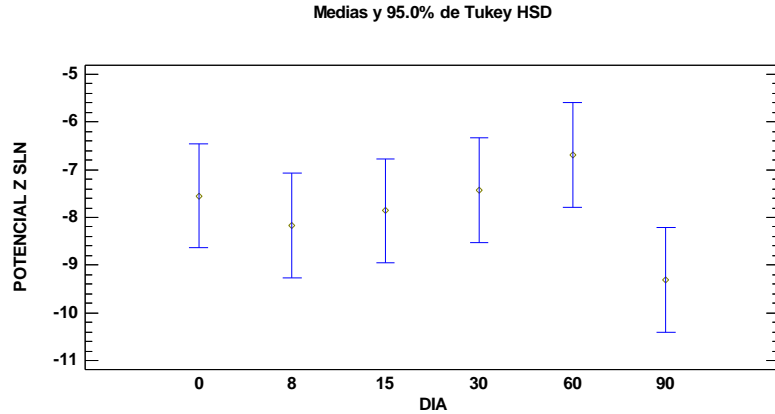


Figura 34. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor DIA sobre el POTENCIAL Z (n=3).

Tabla 22. Pruebas de rangos múltiples para POTENCIAL Z por DIA de las SLN. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 8		0.621111	2.18161
0 - 15		0.307778	2.18161
0 - 30		-0.12037	2.18161
0 - 60		-0.855926	2.18161
0 - 90		1.76111	2.18161
8 - 15		-0.313333	2.18161
8 - 30		-0.741481	2.18161
8 - 60		-1.47704	2.18161
8 - 90		1.14	2.18161
15 - 30		-0.428148	2.18161
15 - 60		-1.1637	2.18161
15 - 90		1.45333	2.18161
30 - 60		-0.735556	2.18161
30 - 90		1.88148	2.18161
60 - 90	*	2.61704	2.18161

La Tabla 22 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

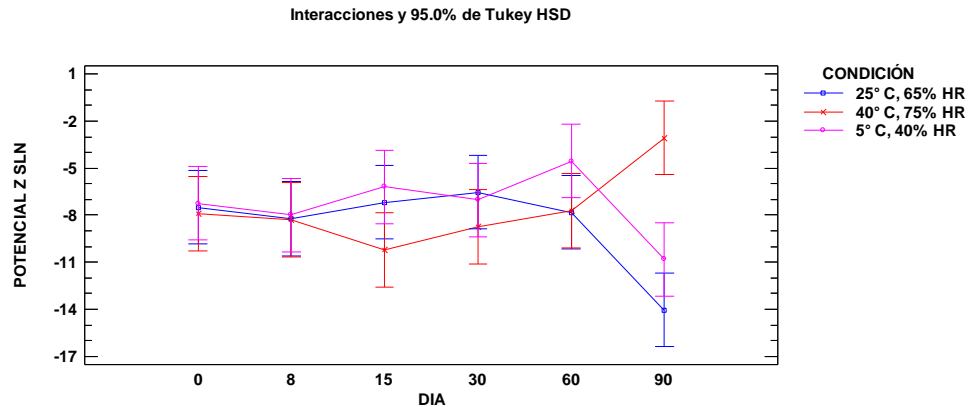


Figura 35. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre el POTENCIAL Z (95% de Tukey, n=3).

ESTABILIDAD DE LOS NLC

- TALLA

Tabla 23. Análisis de Varianza para TALLA de los NLC.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:DIA	21843.5	5	4368.69	7.93	0.0000
B:CONDICIÓN	11703.3	2	5851.63	10.62	0.0002
INTERACCIONES					
AB	12163.5	10	1216.35	2.21	0.0402
RESIDUOS	19835.7	36	550.991		
TOTAL (CORREGIDO)	65545.9	53			

La Tabla 23 descompone la variabilidad de TALLA en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que los valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre TALLA con un 95.0% de nivel de confianza.

Medias y 95.0% de Tukey HSD

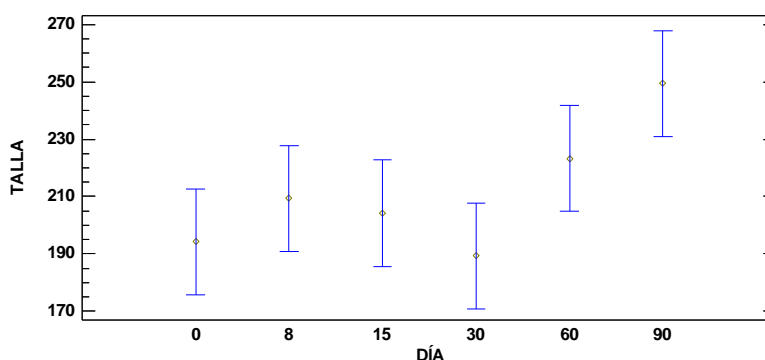


Figura 36. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor DIA sobre el tamaño de partícula (n=3).

Tabla 24. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por DIA de los NLC. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 8		-15.0815	36.9679
0 - 15		-9.92593	36.9679
0 - 30		4.85926	36.9679
0 - 60		-29.0593	36.9679
0 - 90	*	-55.237	36.9679
8 - 15		5.15556	36.9679
8 - 30		19.9407	36.9679
8 - 60		-13.9778	36.9679
8 - 90	*	-40.1556	36.9679
15 - 30		14.7852	36.9679
15 - 60		-19.1333	36.9679
15 - 90	*	-45.3111	36.9679
30 - 60		-33.9185	36.9679
30 - 90	*	-60.0963	36.9679
60 - 90		-26.1778	36.9679

La Tabla 24 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 4 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

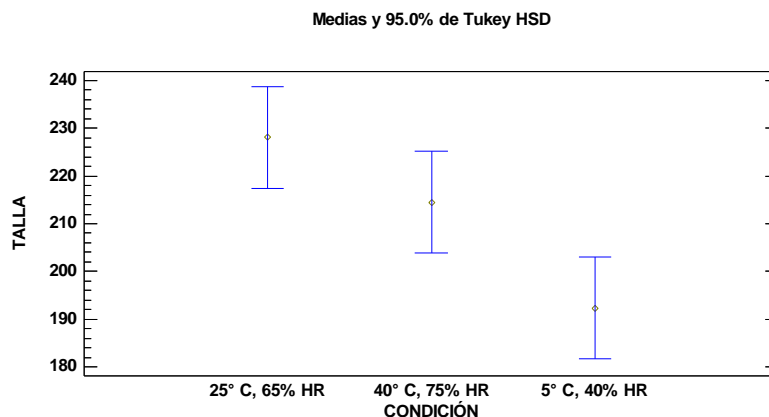


Figura 37. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor CONDICION sobre el tamaño de partícula (n=3).

Tabla 25. Pruebas de rangos múltiples para TALLA por CONDICION de los NLC. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
25° C, 65% HR - 40° C, 75% HR		13.6185	21.2944
25° C, 65% HR - 5° C, 40% HR	*	35.7259	21.2944
40° C, 75% HR - 5° C, 40% HR	*	22.1074	21.2944

La Tabla 25 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

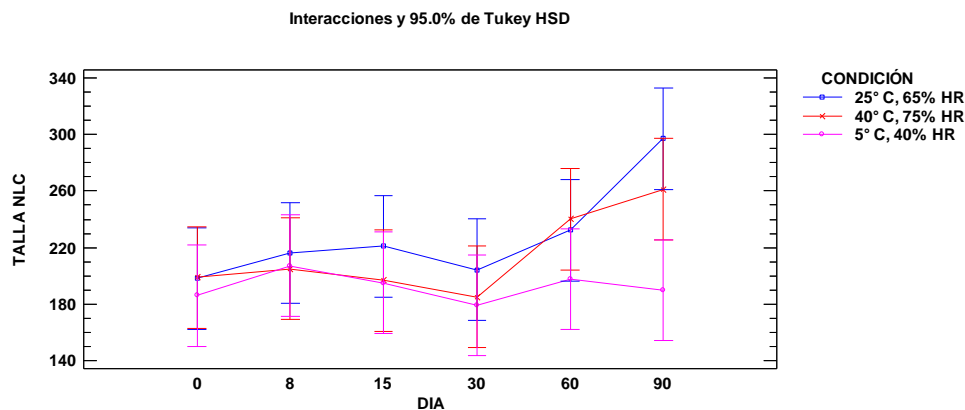


Figura 38. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre la TALLA (95% de Tukey, n=3).

• IP

Tabla 26. Análisis de Varianza para IP de los NLC.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIA	0.0464372	5	0.00928743	10.95	0.0000
B:CONDICIÓN	0.000853123	2	0.000426562	0.50	0.6089
INTERACCIONES					
AB	0.0218197	10	0.00218197	2.57	0.0184
RESIDUOS	0.0305315	36	0.000848097		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0996415	53			

La Tabla 26 descompone la variabilidad de IP en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre IP NLC con un 95.0% de nivel de confianza.

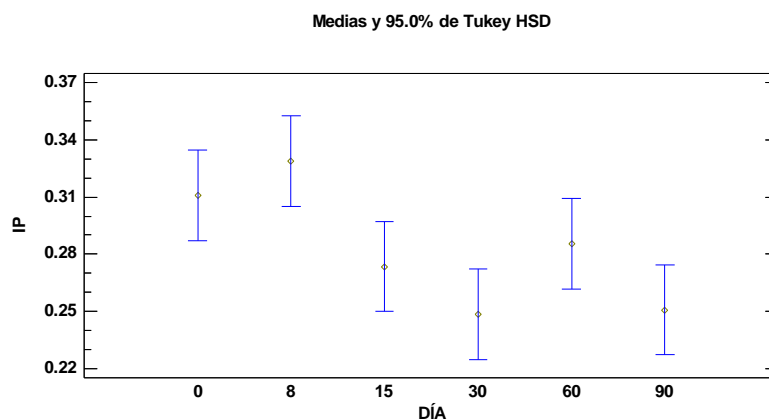


Figura 39. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor DIA sobre el IP (n=3).

Tabla 27. Pruebas de rangos múltiples para IP por DIA de los NLC. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 8		-0.0178889	0.0472845
0 - 15		0.0370741	0.0472845
0 - 30	*	0.0622222	0.0472845
0 - 60		0.0253704	0.0472845
0 - 90	*	0.0597778	0.0472845
8 - 15	*	0.054963	0.0472845
8 - 30	*	0.0801111	0.0472845
8 - 60		0.0432593	0.0472845
8 - 90	*	0.0776667	0.0472845
15 - 30		0.0251481	0.0472845
15 - 60		-0.0117037	0.0472845
15 - 90		0.0227037	0.0472845
30 - 60		-0.0368519	0.0472845
30 - 90		-0.00244444	0.0472845
60 - 90		0.0344074	0.0472845

La Tabla 27 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

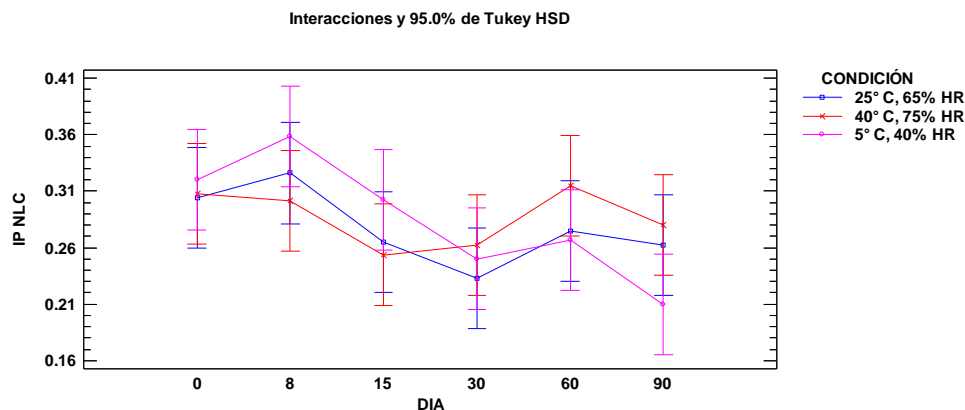


Figura 40. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre el IP (95% de Tukey, n=3).

● **POTENCIAL Z**

Tabla 28. Análisis de Varianza para POTENCIAL Z de los NLC.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:DIA	43.1542	5	8.63084	1.32	0.2774
B:CONDICIÓN	83.182	2	41.591	6.36	0.0043
INTERACCIONES					
AB	183.177	10	18.3177	2.80	0.0113
RESIDUOS	235.267	36	6.53519		
TOTAL (CORREGIDO)	544.78	53			

La Tabla 28 descompone la variabilidad de POTENCIALZ en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre POTENCIAL Z con un 95.0% de nivel de confianza.

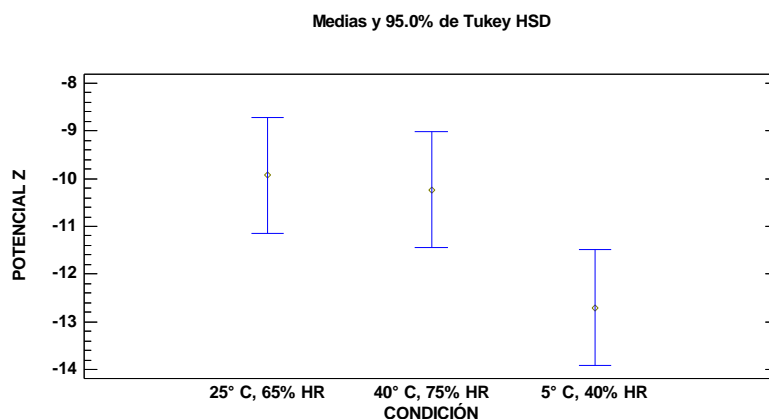


Figura 41. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor CONDICION sobre el Potencial Z (n=3).

Tabla 29. Pruebas de rangos múltiples para POTENCIAL Z por CONDICION de los NLC. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
25° C, 65% HR - 40° C, 75% HR		0.300926	2.43509
25° C, 65% HR - 5° C, 40% HR	*	2.77037	2.43509
40° C, 75% HR - 5° C, 40% HR	*	2.46944	2.43509

La Tabla 29 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

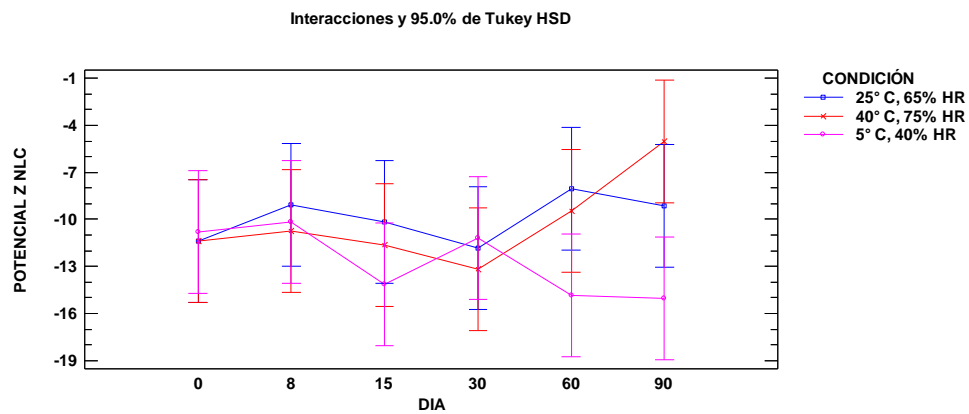


Figura 42. Gráfico de interacciones de los factores DIA y CONDICION y su efecto sobre el POTENCIAL Z (95% de Tukey, n=3).

ANEXO IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: OCLUSIÓN *IN VITRO*

Tabla 30. Análisis de Varianza para el factor de oclusión F.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:TIEMPO	21.2291	2	10.6146	4.37	0.0374
B:TRATAMIENTO	0.215548	1	0.215548	0.09	0.7708
INTERACCIONES					
AB	1.13174	2	0.565869	0.23	0.7956
RESIDUOS	29.1265	12	2.42721		
TOTAL (CORREGIDO)	51.7029	17			

La Tabla 30 descompone la variabilidad de F en contribuciones debidas a varios factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre F con un 95.0% de nivel de confianza.

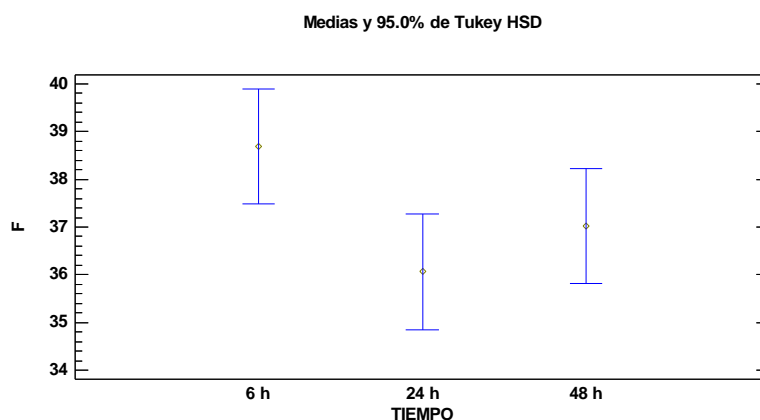


Figura 43. Gráfico de medias de Tukey HSD del efecto del factor TIEMPO sobre el Factor de oclusión F (n=3).

Tabla 31. Pruebas de rangos múltiples para F por TIEMPO. Método: 95% Tukey HSD.

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
6 h - 24 h	*	2.62828	2.4063
6 h - 48 h		1.66964	2.4063
24 h - 48 h		-0.958643	2.4063

La Tabla 31 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

ANEXO V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: TEWL EN PIEL DE CERDO

Piel intacta. Comparación de la reducción del valor de TEWL en porcentaje.

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para REDUCCIÓN DEL TEWL
Valor P aproximado = 0.591099

- Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas
Mediana de muestra 1: 25.8484 (n=8)
Mediana de muestra 2: 29.618 (n=6)

Hipótesis Nula: mediana1 = mediana2
Hipótesis Alt.: mediana1 <> mediana2

Rango Promedio de muestra 1: 6.33333
Rango Promedio de muestra 2: 8.375

W = 31.0 valor-P = 0.401385
No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Piel sin EC. Comparación de la reducción del valor de TEWL en porcentaje.

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para TEWL
Valor P aproximado = 0.448738

- Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas
Mediana de muestra 1: 5.05035 (n=6)
Mediana de muestra 2: 3.81933 (n=6)

Hipótesis Nula: mediana1 = mediana2
Hipótesis Alt.: mediana1 <> mediana2

Rango Promedio de muestra 1: 7.16667
Rango Promedio de muestra 2: 5.83333

W = 14.0 valor-P = 0.575171
No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

ANEXO VI. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ROJO DE NILO

Tabla 32. Datos de la Curva de Calibración de rojo de nilo.

Sistema	Concentración (µg/mL)	Absorbancia	Absorbancia/concentración
1	1.005	0.1168	0.116
2	0.804	0.0928	0.115
3	0.603	0.0706	0.117
4	0.402	0.0453	0.113
5	0.201	0.0229	0.114
6	0.101	0.0095	0.095
7	0.050	0.0037	0.074
8	0.040	0.0027	0.067
9	0.030	0.0019	0.063
1	1.005	0.1171	0.117
2	0.804	0.0944	0.117
3	0.603	0.0697	0.116
4	0.402	0.0457	0.114
5	0.201	0.0217	0.108
6	0.101	0.0095	0.095
7	0.050	0.0037	0.074
8	0.040	0.0027	0.067
9	0.030	0.0021	0.070
1	1.005	0.1158	0.115
2	0.804	0.0931	0.116
3	0.603	0.0702	0.116
4	0.402	0.0455	0.113
5	0.201	0.0223	0.111
6	0.101	0.0095	0.095
7	0.050	0.0039	0.078
8	0.040	0.0028	0.070
9	0.030	0.0017	0.056
		MEDIA	0.097
		DE	0.022
		CV	22.393

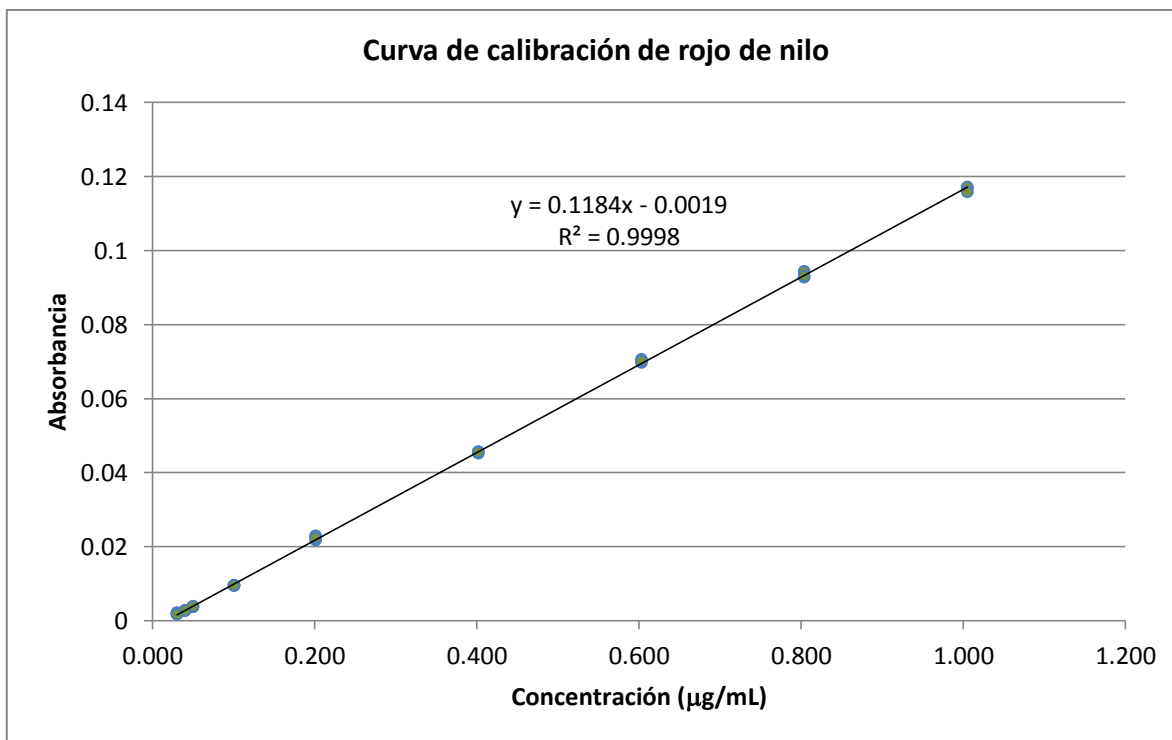


Figura 44. Curva de calibración de rojo de nilo en medio de metanol con EC.

Tabla 33. Parámetros de la curva de calibración de rojo de nilo

Pendiente	118.40 mL/µg
Ordenada al origen	-0.0019
R ²	0.9998
LC	0.0402 µg/mL
LD	0.0302 µg/mL

El límite de cuantificación (LC) y el límite de detección (LD) se determinaron por medio de los CV de las lecturas obtenidas para cada punto. Se observó buena reproducibilidad para la concentración 0.0402 µg/mL (CV=2.11) por lo que se consideró como el LC. El LD se estableció en la concentración más baja de la curva 0.0302 µg/mL.

ANEXO VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO: PRUEBA DE PENETRACIÓN

Comparación de la distancia máxima de penetración del rojo de nilo

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para DISTANCIA MAX
Valor P aproximado = 0.448738
- Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas
Mediana de muestra 1: 13.125 (n=6)
Mediana de muestra 2: 12.125 (n=6)

Hipótesis Nula: mediana1 = mediana2
Hipótesis Alt.: mediana1 <> mediana2

Rango Promedio de muestra 1: 7.33333
Rango Promedio de muestra 2: 5.66667

W = 13.0 valor-P = 0.46961
No se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.

Comparación de la cantidad de rojo de nilo total penetrada

- Prueba de Kolmogorov-Smirnov para CANTIDAD
Valor P aproximado = 0.0049575
- Prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para comparar medianas
Mediana de muestra 1: 4.2648 (n=6)
Mediana de muestra 2: 1.79977 (n=6)

Hipótesis Nula: mediana1 = mediana2
Hipótesis Alt.: mediana1 <> mediana2

Rango Promedio de muestra 1: 9.5
Rango Promedio de muestra 2: 3.5

W = 0 valor-P = 0.00507498
Se rechaza la hipótesis nula para alfa = 0.05.